

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE

TOME SOIXANTE-DIX-SEPTIÈME

Juillet-Décembre 1949

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1943

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE DIFFÉRENTES TOXINES HÉMOLYTIQUES ACTIVITÉ DES SÉRUMS ANTI-GANGRÉNEUX ET ANTI-*CHAUVEI*

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER, M. FABRE et G. BÉCOULET.

(Institut Pasteur.)

L. Kamen, en 1904, a constaté que l'activité hémolytique de la toxine *perfringens* diminue au contact de l'air [19].

En 1936, J. M. Neill a montré, d'une part, que l'hémotoxine du pneumocoque s'inactive par oxydation et redevient active en présence d'un réducteur, d'autre part, que l'action hémolytique de la toxine *perfringens* oxydée est intensifiée par les agents réducteurs [22]. Rappelons, dès maintenant, qu'il est actuellement convenu de désigner par θ l'hémolysine *perfringens* oxydable et par α l'antigène *perfringens* qui devient notablement hémolytique en présence de Ca.

En 1928, L. Cotoni et N. Chambrin ont signalé que les sérums anti-*perfringens* neutralisent l'hémolysine oxydable du pneumocoque, alors que le sérum anti-pneumococcique étudié par eux n'exerce pas d'action franchement anti-hémolytique sur la toxine *perfringens* [2].

En poursuivant l'étude des hémotoxines oxygéo-labiles, E. W. Todd a d'abord établi (1934-1938) que les sérums riches en anti-streptolysine O neutralisent à une dilution élevée la pneumolysine et la tétanolysine ; il a ensuite observé (1941) que l'anti-streptolysine O neutralise l'hémolysine *perfringens* θ et, réciproquement, que l'anti-hémolysine θ neutralise la streptolysine O [23].

Après avoir mis en évidence que l'hémolysine histolytique est sensible aux phénomènes d'oxydo-réduction, M. Guillaumie (1942) a signalé que l'anti-hémolysine θ neutralise l'hémolysine oxydable de la toxine histolytique [6]; M. Guillaumie et G. Bécoulet ont indiqué que cette anti-hémolysine neutralise aussi la tétanolysine [41]. D'après A. Kréguer et M. Guillaumie, l'anti-tétanolysine neutralise de fortes quantités d'hémolysines θ et histolytique [20]. Enfin, nous avons observé, ainsi qu'on le verra plus loin, que les sérums anti-histolytiques sont très anti-hémolytiques vis-à-vis de l'hémolysine θ et de la tétanolysine lorsqu'ils possèdent un fort pouvoir anti-hémolytique sur la toxine histolytique.

L'ensemble de ces données apporte nettement la preuve d'une relation sérologique entre les hémolysines oxydables de germes très différents: Pneumocoque, Streptocoque, *W. perfringens*, *Pl. tetani* et *Cl. histolyticum*.

D'après M. Guillaumie et G. Bécoulet, les antitoxines α et θ des sérums anti-*perfringens* délipidés à basse température sont dépourvues d'action anti-hémolytique vis-à-vis de la toxine vibron septique [41]. M. Guillaumie et A. Kréguer ont signalé que l'anti-hémolysine θ ne supprime pas l'effet hémolytique de la toxine *chauvæi* [43]. Dans les expériences de A. Kréguer et M. Guillaumie, les sérums anti-tétaniques n'ont pas un pouvoir anti-hémolytique supérieur à celui des sérums normaux vis-à-vis des toxines vibron septique, *chauvæi* et *hæmolyticum* [20].

Pour approfondir l'étude des propriétés hémolytiques des toxines vibron septique, *chauvæi* et *hæmolyticum*, nous avons évalué l'intensité de leur action dans diverses conditions; simultanément, nous avons recherché l'effet anti-hémolytique que les sérums anti-*perfringens*, anti-*chauvæi* et anti-gangréneux polyvalents exercent *in vitro* sur ces toxines. De plus, nous avons examiné l'action de quelques sérums sur les toxines *perfringens* α et β , sur la toxine du *Cl. œdematiens* type A, sur les toxines tétanique, pneumococcique, staphylococcique et sur la streptolysine S. En outre, nous avons étudié l'activité antitoxique *in vivo*, anti-lécithinase et anti-hémolytique *in vitro*, ainsi que le pouvoir agglutinant de divers sérums avant et après délipidation, avant et après formolage et chauffage.

Nous remercions bien vivement notre collègue, M. Faure d'avoir effectué la délipidation de nos sérums.

PROPRIÉTÉS HÉMOLYTIQUES DES TOXINES
hæmolyticum, *chauvæi*, VIBRION SEPTIQUE,
STREPTOCOCCIQUE S ET STAPHYLOCOCCIQUE α .

D'après nos observations, la toxine *hæmolyticum*, titrée à différents pH en présence de phosphates et de ClNa, est très hémolytique.

lytique à pH 6,5 (1) ; elle l'est moins à pH très alcalin. Eprouvée dans les mêmes conditions, la toxine *chauvœi* manifeste aussi une forte action hémolytique en solution phosphatée, à pH 6,5, tous les titrages étant effectués en présence de 0,1 cm³ d'une suspension à 5 p. 100 d'hématies lavées de mouton. Les hématies sont lavées trois fois avec de l'eau physiologique stérile, préparée le jour même et ajustée à pH 6,9 par addition de soude ; elles sont utilisées en suspension dans le liquide qui sert à diluer la toxine : eau physiologique tamponnée à différents pH par des phosphates ou eau physiologique ordinaire à pH 6,9.

Des doses décroissantes de la toxine à titrer sont réparties dans des tubes, puis additionnées des globules ; le volume, dans chaque tube, est amené à 1 cm³ ; les tubes sont mis à 37° pendant quatre heures, puis à 2° jusqu'au lendemain. Les résultats sont alors notés : nous prenons comme dose minima hémolytique (D. H.) d'une toxine la plus petite quantité de toxine qui hémolyse totalement les globules employés.

ACTION DE LA CYSTÉINE SUR LES TOXINES « HÆMOLYTICUM » ET « CHAUVOEI » ATTÉNUÉES. — Sept préparations de toxine *hæmolyticum* et 12 de toxine *chauvœi* ont été conservées à la température de 2° dans des tubes bouchés au coton. L'effet hémolytique de 5 toxines *hæmolyticum* a présenté une atténuation très nette après quinze à trente jours de conservation ; 2 toxines sont restées stables à 2° pendant deux et trois mois, puis leur titre a baissé. En ajoutant 1 p. 1.000 de cystéine à une toxine atténuée que nous avions préparée un mois avant, nous avons augmenté l'effet hémolytique de la toxine sans cependant rétablir l'activité initiale ; D. H. en l'absence de cystéine : 0,08 cm³ ; en présence de cystéine : 0,02 cm³ ; D. H. initiale : 0,001 cm³. La cystéine ajoutée à 2 toxines atténuées préparées depuis huit et dix mois n'a pas intensifié leur action hémolysante. Le titrage des 3 toxines *hæmolyticum*, avant et après addition de cystéine, a été fait en présence de phosphate pH 6,5. Le fait que la cystéine peut augmenter dans ces conditions l'activité d'une toxine *hæmolyticum* préparée depuis peu incite à penser qu'il existe vraisemblablement une hémolysine oxydable, réactivable, dans certaines préparations de toxine *hæmolyticum*.

Après quarante-cinq jours de conservation au frigidaire, 6 préparations de toxine *chauvœi* avaient perdu 62 à 85 p. 100 de leur

(1) Pour obtenir une solution à pH 6,5, nous ajoutons 68 cm³ de phosphate monopotassique M/15 à 32 cm³ de phosphate disodique M/15, les deux phosphates étant dissous dans de l'eau distillée additionnée de 9 p. 1.000 de ClNa ; c'est ce que nous appelons de l'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 par des quantités appropriées de phosphates.

activité hémolytique ; la cystéine n'a pas activé 5 de ces préparations ; elle a appréciablement augmenté l'activité de la sixième : en effet, la dose minima hémolytique de cette toxine était égale à 0,009 cm³ en l'absence de cystéine et à 0,005 cm³ en présence de cystéine ; la dose hémolytique à l'état frais était de 0,003 cm³ (titrages en présence de phosphates pH 6,5). Les 6 autres préparations de toxine *chauvœi* ont été titrées en présence d'eau physiologique, après deux mois de conservation : 4 avaient alors perdu 60 à 90 p. 100 de leur activité hémolytique ; la cystéine n'a pas modifié le titre de 2 de ces toxines, elle a légèrement augmenté celui des 2 autres. Les 2 dernières toxines *chauvœi* atténuées ont été additionnées de CL2 Ca deux mois après leur préparation ; l'activité hémolytique n'a pas été influencée par l'ion Ca ; dose minima hémolytique des 2 toxines en présence comme en l'absence de cet ion : 0,006 cm³. Le chlorure de Ca est utilisé comme dans nos expériences sur la toxine *perfringens* [9, 12].

ESSAIS D'ULTRAFILTRATION DES TOXINES « CHAUVOEI » ET VIBRION SEPTIQUE. — Nous nous sommes demandé si l'hémolysine non oxydable de la toxine *chauvœi* traverse les membranes de cellophane de faible porosité. Pour en décider, nous avons ultrafiltré sous pression différentes préparations de toxine *chauvœi* ; nous avons utilisé d'abord des membranes dont le diamètre des pores était de 4,5 m μ , ensuite des membranes de porosité égale à 10 et 21 m μ (2). Après avoir mis dans l'intérieur d'un ultrafiltre 10 ou 15 cm³ d'une préparation donnée de toxine, nous avons généralement poursuivi la filtration jusqu'à ce que le volume du filtrat soit de 4 ou 5 cm³. La filtration a été faite à la température du laboratoire. Les toxines témoins, c'est-à-dire les toxines non soumises à l'ultrafiltration, ont été conservées à la température du laboratoire. Nous avons titré comparativement : les différents *filtrats*, les liquides restés à l'intérieur des ultrafiltres — c'est-à-dire les *résidus* de filtration — et, enfin, les toxines *témoins*. Aucun des *filtrats* n'a manifesté d'activité hémolytique à la dose de 0,2 cm³ ; par contre, certaines toxines témoins contenaient 500 et même 1.000 D. H. par centimètre cube, d'après les titrages faits en présence d'eau physiologique phosphatée à pH 6,5 ; ces résultats montrent que l'hémolysine *chauvœi* ne traverse pas les membranes de 4,5, de 10 et 21 m μ . Mais, étant donné que le pouvoir hémolytique des résidus de filtration a été comparable à celui des toxines témoins, on peut penser que les membranes employées adsorbent l'hémolysine *chauvœi*. Ces expériences ont été faites avec des toxines préparées à partir de bouillons Vf additionnés, par litre, de 5 g. de peptone 5 B et de 2 g. de glucose.

(2) Nous remercions vivement M. Grabar d'avoir mis à notre disposition son appareil à ultrafiltration sous pression.

Nos essais ont porté sur 3 préparations de toxine *chauvœi* de pH compris entre 4,8 et 5,4 ; elles ont été obtenues en centrifugeant une culture de trois jours (1 préparation) et 2 cultures âgées de vingt-quatre heures (2 préparations). Les 3 toxines ont été filtrées sans modifier leur pH, l'une d'elles a été filtrée en outre après l'avoir amenée à pH 7,45 par addition de NaOH. A partir des toxines acides, nous avons obtenu des filtrats de pH égal à 4,8, 5,3 et 5,35 ; les composés responsables de l'acidité de la toxine *chauvœi* traversent donc les membranes utilisées. La toxine ajustée à pH 7,45 a fourni un filtrat alcalin.

Nous donnerons en détail, par ailleurs, l'ensemble des résultats que nous avons observés *in vitro* au cours de cette étude, ainsi que les observations que nous avons faites *in vivo* en recherchant par le procédé des injections intraveineuses à la souris, la nocivité des filtrats, des résidus de filtration et des toxines *chauvœi* témoins titrés comparativement.

Après avoir examiné les propriétés des toxines *chauvœi* ultrafiltrées, nous avons soumis une toxine vibron septique à l'ultrafiltration. Dans cette expérience préliminaire, nous avons utilisé une toxine que nous conservions à la température de 2° depuis un an ; l'an dernier, aussitôt après son obtention, elle contenait, par centimètre cube : 25 D. H. et, d'après les titrages sur souris (veines), 300 doses mortelles (D. M.). Juste avant de l'ultrafiltrer, elle contenait, par centimètre cube, 20 D. H. et seulement 10 D. M. Nous avons réalisé l'ultrafiltration sur des membranes de porosité égale à 4,5 et 29 μ . Les filtrats obtenus n'ont pas exercé le moindre effet hémolytique à la dose de 0,4 cm^3 et n'ont pas tué les souris à la dose intraveineuse de 0,5 cm^3 . Il apparaît ainsi que les constituants nocifs de la toxine vibron septique ne traversent pas les membranes dont les pores ont un diamètre de 4,5 et 20 μ . (Toxine préparée à partir d'un bouillon Vf additionné, par litre, de 5 g. de peptone Chapoteaut et de 5 g. de glucose).

STREPTOLYSINE S, STAPHYLOLYSINE α ET PNEUMOLYSINE. — Les cultures centrifugées de Streptocoque, de Pneumocoque ou de Staphylocoque que nous avons titrées ont manifesté sensiblement la même activité hémolytique en présence d'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 par des phosphates qu'en présence d'eau physiologique ordinaire à pH 6,9.

Afin d'expérimenter avec une toxine streptococcique riche en streptolysine S, nous avons utilisé une culture de streptocoque faite en présence de sérum. La cystéine n'a pas augmenté l'activité de cette toxine pendant la durée de nos essais. M. L. Cotoni nous l'a procurée, ainsi que plusieurs cultures de différentes souches de pneumocoque des types I et V.

M. Mercier nous a fourni deux préparations de staphylo-

sine α . La première a tué les souris à la dose intraveineuse de 1/60 de centimètre cube et lysé, à la dose de 0,003 cm³, en quatre heures à 37°, les globules de mouton présents dans 0,1 cm³ d'une suspension globulaire à 5 p. 100. Elle n'a pas présenté le phénomène de la lyse « chaude-froide ». Ajoutons que l'activité hémolytique de cette préparation n'a pas subi la moindre diminution au contact de l'air pendant quatre semaines de conservation à la température de 2°; c'est dire qu'elle est stable vis-à-vis de l'oxygène.

ACTION DES SÉRUMS SUR DIVERSES TOXINES HÉMOLYTIQUES.

Nous avons fait agir *in vitro* des sérums normaux, des sérums anti-*perfringens* A, anti-histolytiques, anti-gangréneux polyvalents et anti-*chauvæi* sur de nombreuses toxines hémolytiques : toxines *perfringens* θ , α et δ ; toxines *chauvæi*, *hæmolyticum*, *œdematiens* A, vibrion septique, streptococcique S, staphylococcique α , pneumococcique, tétanique, histolytique.

Dose d'épreuve de toxine. L'activité anti-hémolytique des sérums a été déterminée vis-à-vis de 20 D. H. des toxines suivantes : toxines *chauvæi*, *œdematiens*, histolytique et *perfringens* C, précipitées par le sulfate d'ammonium; toxines vibrion septique, *hæmolyticum* et staphylococcique α non précipitées. Elle a été évaluée vis-à-vis de 15 D. H. de pneumolysine du type V, puis vis-à-vis de 10 D. H. de streptolysine S non précipitées. Elle a été recherchée en outre vis-à-vis de la dose LH/10 d'une toxine *perfringens* A précipitée, riche en hémolysine θ : cette dose d'épreuve de toxine représente 65 D. H. Au cours de notre exposé, le titre anti- θ des sérums anti-*perfringens* est exprimé en unités internationales (3).

Conditions expérimentales. Répartir des doses décroissantes du sérum à titrer dans une série de tubes; ajouter dans chaque tube la dose d'épreuve de toxine, porter les tubes pendant quarante-cinq minutes à 37°, puis, dans chacun, ajouter 0,1 cm³ d'une suspension à 5 p. 100 de globules rouges lavés de mouton. Le volume du mélange, dans chaque tube, est, à ce moment, de 1 cm³. Mettre les tubes pendant quatre heures à 37°. Les examiner au bout de ce temps et les placer jusqu'au lendemain dans un frigidaire à 2°; faire alors les lectures définitives.

Les titrages ont été effectués, soit en présence d'eau physiologique ordinaire à pH 6,9, soit en présence d'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 ou à pH 5,5 par des phosphates monopotassique et disodique employés dans les proportions fixées par Sørensen.

Nous avons employé de l'eau physiologique de pH 6,9 lorsque les sérums ont été titrés vis-à-vis des toxines *perfringens* θ et δ , vis-à-vis des toxines pneumococcique, streptococcique et staphylococcique. Nous avons pris de l'eau physiologique phosphatée de pH 6,5 lorsque les

(3) Une unité internationale anti-hémolytique θ neutraliserait 650 D. H. de la toxine *perfringens* A mise en œuvre dans nos titrages.

dosages ont été faits vis-à-vis de l'hémolysine 0, vis-à-vis des toxines *chauvæi*, vibron septique, streptococcique S ; l'eau physiologique phosphatée à pH 5,5 a été utilisée dans quelques titrages avec la toxine vibron septique. Cette énumération indique qu'il nous est arrivé plusieurs fois d'utiliser la même toxine dans différentes conditions.

L'activité hémolytique de la toxine histolytique et le pouvoir anti-hémolytique que les sérums exercent sur l'histolysine ont été déterminés conformément à nos recherches antérieures [5, 6], en utilisant une toxine histolytique dissoute dans un bouillon Vf additionné de cystéine. Les dilutions qu'il est nécessaire de faire au cours des titrages sont effectuées avec de l'eau physiologique ordinaire à pH 6,9.

SÉRUMS ANTI-*perfringens* A. — Nous avons comparé le pouvoir anti-hémolytique des sérums prélevés à deux chevaux avant et après huit inoculations de toxine *perfringens* A formolée. Les sérums récoltés avant l'immunisation expérimentale sont appelés sérums normaux ; ceux que l'on obtient après immunisation sont des sérums anti-*perfringens* riches en antitoxines spécifiques. Les deux sérums normaux ont un léger effet anti-hémolytique

TABLEAU I. — **Activité de divers sérums sur les toxines *perfringens*, *chauvæi*, vibron septique et *hæmolyticum*.**

NUMÉRO de l'animal saigné	NATURE DU SÉRUM	DATE de la saignée	TITRE anti- <i>perfringens</i>		POUVOIR anti-hémolytique vis-à-vis de 20 D. H. de toxine		
			Titre anti- α	Titre anti- θ	<i>Chauvæi</i>	Vibron septique	<i>Hæmolyticum</i>
1258	Anti- <i>perfringens</i> .		150	300	5		5
1211	Normal.		< 1	25-50	2-5	5-10	10
1211	Anti- <i>perfringens</i> .		200	500	2-5	100-200	5-10
217	Normal.				5-10	50-100	
217	Anti- <i>chauvæi</i> .		< 1		1.000	500-750	< 5
238	Normal.	11 déc. 1947.	< 0,5	40-60	10	25	
238	Anti- <i>chauvæi</i> .	7 mai 1948.		200	1.000	500	
238	Anti- <i>chauvæi</i> .	24 sept. 1948.	< 0,5	200-300	1.000	400-600	5
238	Anti- <i>chauvæi</i> .	29 oct. 1948.			1.500	600	
238	Anti- <i>chauvæi</i> .	7 janv. 1949.		40-60	1.500	600-800	
8	Normal.	26 avril 1948.	< 1	80-100	50		10
8	Anti- <i>chauvæi</i> .	24 sept. 1948.		60	800-1.000	110	10
9	Normal.	26 avril 1948.	< 1	5-10	40	30-40	< 2,5
9	Anti- <i>chauvæi</i> .	24 sept. 1948.		80-100	300-500	160	> 2,5
9	Anti- <i>chauvæi</i> .	3 déc. 1948.		5	250	90	

vis-à-vis des toxines θ , *chauvæi*, *hæmolyticum* et *œdematiens*. Les deux sérums anti-*perfringens* contiennent une quantité importante d'antitoxine θ , d'antitoxine α , d'anti-collagénase spécifique [4], d'anti-hyaluronidase, d'anti-gélatinase, etc.; quant à leur activité anti-hémolytique à l'égard des toxines *chauvæi*, *hæmolyticum* et *œdematiens*, elle reste comparable à celle des sérums normaux correspondants. Nous donnons quelques-uns de ces résultats dans le tableau I. Il faut, par exemple, 0,1 cm³ du sérum prélevé au cheval 1258 avant l'immunisation et 0,2 cm³ après l'immunisation pour neutraliser 20 D. H. de toxine *hæmolyticum*. L'immunsérum contient 300 unités anti- θ et 150 unités anti- α par centimètre cube. A la dose de 0,2 cm³, il ne neutralise pas 20 D. H. de staphylolysine α ni 10 D. H. de streptolysine S. Il en est de même des sérums anti-*perfringens* 562 et 716. Par contre ces derniers sérums neutralisent très efficacement l'hémolysine, l'histolysine et la tétanolysine (tableau II).

Le sérum normal 1211 contient 25 à 50 unités anti- θ et moins d'une unité anti- α . Après délipidation, le sérum anti-*perfringens* 1211, de même que le sérum normal correspondant délipidé, ne supprime pas à la dose de 0,25 cm³ l'effet hémolytique de

TABLEAU II. — **Activité des sérums anti-histolytiques et anti-*perfringens* sur les toxines homologues et sur la tétanolysine.**

NATURE DU SÉRUM	NUMÉRO du Cheval	DATE des saignées	POUVOIR antitoxique des sérums vis-à-vis de la dose L + des toxines		POUVOIR anti-hémolytique des sérums vis-à-vis des toxines		
			histolytique (u. i.)	<i>perfringens</i> α (u. i.)	histolytique	<i>perfringens</i> θ	tétanique
Anti-histolytique	447	14 juin 1948.	10-25	< 1	4.000-6.000	25-50	1.500-2.000
Anti-histolytique	447	29 oct. 1948.	200-300	< 1	40.000	4.000	150.000
Anti-histolytique	391	16 juil. 1948.	200-250	< 1	30.000	1.800	40.000
Anti- <i>perfringens</i>	562	14 déc. 1948.	< 1	200-225	4.000	2.400-2.800 u. i.	
Anti- <i>perfringens</i>	716	26 mars 1948.	< 1	300-400	30.000	2.400-2.800 u. i.	25.000

u. i., unités internationales.

20 D. H. de toxine vibron septique ou staphylococcique α ; à cette dose, il ne supprime pas non plus l'action hémotoxique de 10 D. H. de streptolysine S. Ce sérum anti-*perfringens* délipidé titre 400 unités internationales anti- θ et 160 unités anti- α .

SÉRUMS ANTI-HISTOLYTIQUES. — Nous avons signalé, en 1942, que différents sérums anti-histolytiques manifestaient vis-à-vis de l'hémolysine *perfringens* θ un pouvoir anti-hémolytique supérieur à celui des sérums normaux examinés dans les mêmes conditions [6]. Depuis, nous avons eu l'occasion de titrer des sérums anti-histolytiques à divers points de vue ; nous nous sommes rendu compte que lorsque ces immunsérums avaient un titre anti-hémolytique très marqué vis-à-vis de la toxine histolytique, ils possédaient aussi la propriété d'être très anti-hémolytiques à l'égard de la toxine θ . Comparons par exemple l'activité des sérums prélevés, à des dates différentes, à un même cheval auquel sont faites des inoculations régulières d'anatoxine histolytique : le sérum prélevé au cheval 447 au mois de juin 1948, quarante-cinq jours après le début de l'immunisation, neutralise, à la dose de 1/4.000 de centimètre cube, 20 D. H. de toxine histolytique et, à la dose de 1/250 de centimètre cube, 65 D. H. de toxine θ . Le sérum prélevé au mois d'octobre 1948 à ce même cheval est extrêmement actif puisqu'il neutralise, à la dose de 1/40.000 de centimètre cube, 20 D. H. de toxine histolytique ou 65 D. H. de toxine θ . Les inoculations répétées d'anatoxine histolytique ont donc nettement provoqué la formation d'une grande quantité d'anticorps capables de neutraliser l'histolysine et l'hémolysine θ . Dans le tableau II, nous avons noté un autre sérum anti-histolytique de cheval, le sérum 391 : ce sérum est anti-hémolytique aussi vis-à-vis de la toxine θ ; en effet, il peut, à la dose de 1/18.000 de centimètre cube, neutraliser 65 D. H. de toxine θ . Deux de nos sérums anti-*perfringens*, les sérums 562 et 716, produisent le même effet à la dose de 1/24.000. Faisons remarquer que le sérum 562, dont le titre anti- θ est égal à celui du sérum 716, est beaucoup moins actif sur l'histolysine que le sérum 716 : il faut, en effet, 1/4.000 de centimètre cube du sérum 562 et il suffit de 1/30.000 de centimètre cube du sérum 716 pour neutraliser 20 D. H. de toxine histolytique.

Les chiffres du tableau II montrent que les sérums anti-histolytiques, de même que les sérums anti-*perfringens*, neutralisent la tétanolysine. Si on compare le titre anti-tétanolytique du sérum 447 prélevé au début de l'immunisation du cheval 447 à celui du sérum prélevé au même cheval après hyperimmunisation, on voit que les inoculations répétées d'anatoxine histolytique ont déclenché la production d'une forte quantité d'anti-hémolysine susceptible d'inhiber la tétanolysine.

Aucun des sérums anti-histolytiques que nous venons de mentionner n'a pu, à la dose de 0,2 cm³, neutraliser 20 D. H. de staphylolysine, le titrage étant fait en présence d'eau physiologique ordinaire ou d'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 par des phosphates. De nos résultats, il ressort donc que l'anti-

hémolysine histolytique, de même que les antitoxines α et θ , est incapable de neutraliser la staphylolysine non oxydable avec laquelle nous avons expérimenté. Inversement, le sérum anti-staphylococcique α que nous avons utilisé n'a pas été plus actif sur l'histolysine que certains sérums normaux. Dans leurs recherches, J. Célarek et B. Fedgin ont observé que les sérums anti-histolytiques de lapin avaient un léger effet anti-hémolytique vis-à-vis de la toxine staphylococcique employée dans les titrages [4]. Cette notion soulève plusieurs hypothèses.

D'après nos observations, un sérum anti-histolytique délipidé neutralise l'histolysine et l'hémolysine θ et ne neutralise pas l'hémolysine du vibron septique [41].

Deux sérums anti-histolytiques du tableau II contiennent, d'après les titrages sur souris, plus de 200 unités internationales d'antitoxine histolytique. Ils contiennent de l'anti-gélatinase. Rappelons qu'à la suite de nos investigations sur les propriétés anti-gélatinolytiques des sérums anti-gangréneux, nous avons conclu à la spécificité de l'anti-gélatinase histolytique [7]. D'après nos recherches avec M. et A. Delaunay, les sérums anti-histolytiques renferment un taux important d'anti-collagénase spécifique : la détermination de l'activité anti-collagénasique des sérums est effectuée en présence de collagène A ; la teneur en collagénase de la toxine histolytique est déterminée également en présence de ce collagène comme dans les expériences avec la collagénase du *perfringens* [4].

SÉRUMS ANTI-GANGRÉNEUX POLYVALENTS. — Nous avons préparé des sérums anti-gangréneux polyvalents en mélangeant dans diverses proportions des sérums équins anti-*perfringens*, anti-vibron septique, anti-histolytique et anti-*œdematiens*. Nous avons dénommé GG 1 et GG 2, deux de ces mélanges polyvalents ; nous avons déterminé leurs propriétés anti-hémolytiques *in vitro* et antitoxiques *in vivo* avant de les délipider et après les avoir traités par les solvants des lipides.

Techniques de l'extraction des lipides. — Les deux sérums polyvalents GG 1 et GG 2 ont été soumis à une extraction de courte durée selon la technique que nous désignons par : procédé I. Une partie du sérum GG 2 a été en outre longuement traitée par les solvants des lipides selon le mode opératoire de Hewitt ; nous désignerons cette dernière technique par : procédé II.

Procédé I. — Les sérums sont soumis à une extraction de courte durée. En s'inspirant des méthodes de Hardy et Gardiner [45], de Hartley [46], de Hewitt [47], nos sérums ont été traités comme il suit : un volume de sérum à 0° est additionné de 6 volumes d'un mélange à - 15° d'alcool absolu (7 parties) et

d'éther anhydre (3 parties). Le mélange obtenu est laissé pendant deux heures à -10° ; la sérumalbumine et les globulines précipitent ; le tout est centrifugé dans un appareil refroidi à -20° . Le précipité est lavé deux fois avec un volume d'alcool-éther glacé (-10 à -20°) égal à celui du sérum employé et cinq fois avec un volume d'éther anhydre glacé (-10 à -20°). La durée des 7 lavages varie entre quatre et cinq heures. Après quarante-huit heures de dessiccation sous le vide (en présence de SO_4H_2), le précipité est dissous dans de l'eau distillée stérile ; le volume de la solution préparée est égal au volume initial du sérum.

Les sérums que nous avons cités en 1947 et 1948 [11, 13] ont été traités par ce procédé.

Procédé II. — Les sérums sont soumis à une extraction prolongée.

Comme dans les expériences précédentes, le sérum à 0° est additionné de 6 volumes d'alcool-éther à -15° ; le mélange est maintenu pendant deux heures à -10° ; le précipité qui se forme est séparé par centrifugation à froid, puis lavé deux fois à l'alcool-éther et cinq fois à l'éther-glacé. Après ces lavages, le précipité n'est pas immédiatement desséché comme on le fait dans le procédé I ; il est mis dans la cartouche d'un appareil à extraction continue à froid. Cet appareil contient de l'éther-anhydre. Après deux heures d'extraction, l'éther est renouvelé et l'extraction poursuivie pendant vingt heures. Ce n'est qu'après cette longue extraction que le précipité est desséché sous le vide, pendant quarante-huit heures, dans un excicateur contenant de l'acide sulfurique ; après quoi, le précipité est repris par une quantité suffisante d'eau distillée pour atteindre le volume initial du sérum.

Propriétés anti-hémolytiques des sérums anti-gangréneux polyvalents. — Après extraction par le procédé I, le sérum anti-gangréneux polyvalent GG I contient 40 unités anti- α et 600 unités anti- θ ; à la dose de $0,2 \text{ cm}^3$, il ne neutralise pas 20 D. H. de toxine *chauvœi*.

Après le traitement par le procédé I le sérum polyvalent GG 2 titre 160 unités anti- α et 275 à 300 unités anti- θ ; à la dose de $0,1 \text{ cm}^3$, il ne neutralise pas 20 D. H. de toxine *chauvœi* ; à la dose de $0,5 \text{ cm}^3$, il inhibe 20 D. H. de staphylolysine α . Après extraction par le procédé II, son titre anti- α est compris entre 110 et 120 unités d'après les titrages sur souris et son titre anti- θ entre 275 et 300 unités internationales ; il est incapable, à la dose de $0,2 \text{ cm}^3$, de neutraliser la dose d'épreuve d'hémolysine *chauvœi*.

Avant la délipidation, il fallait $0,1 \text{ cm}^3$ du sérum GG 2 pour neutraliser 20 D. H. de toxine *chauvœi*, $0,5 \text{ cm}^3$ pour neutraliser

20 D. H. de staphylolysine α (4) et 0,2 cm³ pour inhiber 10 D. H. de streptolysine S (tableau III). De tels chiffres indiquent que ce sérum anti-gangréneux n'a qu'un très faible pouvoir anti-hémolytique sur les 3 hémolysines considérées; en rapprochant ces chiffres de ceux que nous avons obtenus en titrant le sérum après délipidation, on s'aperçoit que la délipidation par le procédé I n'influence pas l'activité insignifiante que le sérum possède à l'égard de la staphylolysine α .

Les données numériques inscrites dans le tableau III montrent

TABLEAU III. — Propriétés de deux sérums anti-gangréneux polyvalents.

ANTIGÈNE utilisé pour faire les titrages	SÉRUM GG 1	SÉRUM ANTI-GANGRÉNEUX GG 2		
	Traité par le procédé I	Non délipidé	Traité par le procédé I	Traité par le procédé II
Activité anti-hémolytique <i>in vitro</i> (unités)				
Toxine <i>perfringens</i> θ . . .	600	600-700	275-300	275-300
Toxine histolytique . . .		5.000-6.000	2.500	
Toxine tétanique		15 000	3.000	
Pneumolysine		3 500	4.000	
Toxine <i>chauvæi</i>	< 5	10	< 10	< 5
Toxine vibron septique .	< 4	300	< 10	< 5
Staphylolysine α		2 à 5	2 à 5	
Streptolysine s		5 à 10		
Titre anti-lécithinasique <i>in vitro</i> (unités internationales)				
Toxine <i>perfringens</i> α . .		140	120	110
Titre antitoxique <i>in vivo</i> (unités internationales)				
Toxine <i>perfringens</i> α . .	40	160	160	110-120
Toxine <i>chauvæi</i>	< 5	400-600	< 5	
Toxine vibron septique .	150	200	170	190
Toxine histolytique . . .	20	60	35-40	35-40
Toxine <i>œdematiens</i> . . .	150	40-50	40	30-35

que le sérum anti-gangréneux GG 2 non délipidé est non seulement actif sur l'hémolysine *perfringens* θ , mais encore sur l'histolysine, la tétanolysine et la pneumolysine. Elles montrent

(4) En titrant dans les mêmes conditions 5 sérums normaux équins, nous avons constaté que 3 d'entre eux étaient également capables, à la dose de 0,5 cm³, de neutraliser 20 D. H. de staphylotoxine α . Parmi les 2 autres, un était actif à la dose de 0,05 cm³ et l'autre inactif à la dose de 0,5 cm³ (tableau IV).

en outre que la délipidation par le procédé I diminue de deux à cinq fois le pouvoir anti-hémolytique de ce sérum vis-à-vis des hémolysines oxydables considérées.

SÉRUMS ANTI-*chauvæi*. — Quatre chevaux et 5 bœufs ont été immunisés contre les antigènes de *Cl. chauvæi* ; du sérum a été prélevé aux animaux avant l'immunisation et très fréquemment au début de celle-ci afin de suivre de près les variations des diverses propriétés des sérums. Nous avons titré tous les sérums avant délipidation et 3 sérums après un traitement de courte durée par l'alcool-éther ; l'activité d'un sérum a été recherchée en outre après action prolongée des solvants des lipides.

1° Sérums non délipidés de chevaux. — Avant l'immunisation, les sérums de deux chevaux normaux titraient respectivement 5 à 10 et 10 unités anti-*chauvæi*. Dès les premiers mois de l'immunisation de ces deux chevaux, nous avons constaté que l'activité anti-hémolytique des sérums vis-à-vis de la toxine *chauvæi* augmentait progressivement. Les deux sérums, prélevés cinq mois après le début de l'immunisation, ont eu respectivement comme titre 1.000 et 1.000 à 1.500 unités anti-*chauvæi*. Ces deux sérums anti-*chauvæi* se sont montrés considérablement plus anti-hémolytiques à l'égard de la toxine vibron septique que les sérums normaux correspondants.

L'un de ces sérums anti-*chauvæi* a été éprouvé vis-à-vis de la toxine *œdematiens* ; il n'a pas été plus anti-hémolytique que le sérum normal correspondant ; sa teneur en antitoxine α , de même que celle des autres sérums anti-*chauvæi* prélevés à des dates différentes aux autres chevaux hyperimmunisés, est restée inférieure à une unité (titrages en présence de sérum humain, de Ca et d'une toxine *perfringens* précipitée par le sulfate d'ammonium). Ainsi, l'hyperimmunisation anti-*chauvæi* n'augmente pas l'efficacité des sérums vis-à-vis des toxines *œdematiens* et α .

Le titre anti- θ des sérums provenant des quatre chevaux en expérience n'a pas présenté de variations significatives au cours des quatre premiers mois de l'immunisation. A partir du cinquième mois, une augmentation du pouvoir inhibiteur des sérums prélevés tous les vingt jours à l'un des chevaux (cheval 238) s'est manifestée vis-à-vis de l'hémolysine θ , et ceci a duré pendant plusieurs mois ; puis, l'activité anti- θ des saignées ultérieures faites à ce cheval a fléchi alors que le pouvoir anti-hémolytique anti-*chauvæi* restait élevé. L'accroissement temporaire de l'activité anti- θ des sérums successivement fournis par ce cheval hyperimmunisé contre le *Cl. chauvæi* correspond-il à une variation fortuite des lipides ou révèle-t-il l'apparition d'une anti-hémolysine capable d'inhiber l'hémolysine oxydable θ ?

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons décidé de délipider l'échantillon de sérum le plus actif sur l'hémolysine θ (saignée du 24 septembre 1948). Mais au préalable nous avons recherché son activité vis-à-vis de trois autres hémolysines oxydables : pneumolysine, tétanolysine et histolysine ; en même temps, nous avons titré le sérum qui avait été prélevé au cheval avant l'immunisation ; nous avons constaté que le sérum normal était moins actif sur ces trois hémolysines que le sérum anti-*chauvæi* examiné.

Lorsque nous avons fait agir 5 sérums anti-*chauvæi* sur 20 D. H. de staphylolysine α , nous avons constaté qu'ils n'étaient pas plus actifs que des sérums normaux ; certains de ces immun-sérums étaient cependant capables, à la dose de 1/1.500 de centimètre cube, de neutraliser 20 D. H. de toxine *chauvæi*, ce qui porte à croire que l'anti-hémolysine *chauvæi* est inefficace sur la staphylolysine α .

À la suite de ces observations, nous avons recherché l'influence de l'anti-staphylolysine α sur l'effet hémolytique de la toxine *chauvæi*. Pour cette étude, nous avons disposé d'un sérum capable à la dose de 0,01 cm³ de neutraliser 20 D. H. de staphylolysine α ; ce sérum n'a pu, à la dose de 0,1 cm³, neutraliser 20 D. H. de toxine *chauvæi* (ces divers titrages ont été effectués, comme les précédents, en présence d'hématies lavées de mouton et selon notre technique habituelle).

Dans le but de déterminer l'effet de l'anti-hémolysine *chauvæi* sur l'hémolysine δ des toxines *perfringens* de type C, nous avons fait agir sur un échantillon de cette toxine deux sérums anti-*chauvæi* prélevés à deux chevaux le cinquième mois de l'immunisation ; en titrant parallèlement les sérums normaux, nous avons constaté que le pouvoir inhibiteur de chaque immun-sérum était comparable à celui du sérum normal correspondant. De crainte que la teneur en antitoxines α et θ de ces quatre sérums ait été insuffisante pour inhiber les toxines α et θ présentes dans la toxine C employée et que cette possibilité ait eu pour conséquence de masquer l'effet inhibiteur des sérums vis-à-vis de l'hémolysine δ , nous avons fait agir les sérums normaux et anti-*chauvæi* sur la toxine C préalablement additionnée de sérum anti-*perfringens* A riche en antitoxines α et θ . De cette série de titrages il ressort que le pouvoir anti-hémolytique δ des sérums anti-*chauvæi* est comparable à celui des sérums normaux correspondants.

En ajoutant à de la toxine *hæmolyticum* les sérums prélevés avant et pendant l'immunisation anti-*chauvæi* de deux chevaux, nous avons constaté que même les sérums les plus riches en anti-hémolysine *chauvæi* ne manifestaient pas, vis-à-vis de la toxine *hæmolyticum*, un pouvoir anti-hémolytique différent de celui des

sérums normaux. Nous avons pensé que la présence éventuelle d'une hémolysine oxydable dans la toxine *hæmolyticum* employée pouvait laisser passer inaperçue, dans les titrages précédents, la neutralisation de l'hémolysine *hæmolyticum* non oxydable. L'addition d'anti-hémolysine θ n'a pas permis de mettre en évidence une telle neutralisation par les sérums anti-*chauvæi*.

Les quatre sérums anti-*chauvæi* que nous avons examinés n'ont pu, à la dose de 0,1 cm³, neutraliser 10 D. H. de streptolysine S.

2° *Sérums non délipidés de bovins*. — Les deux bœufs n^{os} 8 et 9, destinés à recevoir des inoculations de culture *chauvæi*, avaient fourni, avant l'immunisation, des sérums qui titraient respectivement 50 et 40 unités anti-hémolytiques vis-à-vis de la toxine *chauvæi* et moins d'une unité anti- α (5). Cinq mois après le début de l'immunisation, le titre anti- α des deux sérums était inférieur à une unité ; leur titre anti-*chauvæi* était important : l'un des sérums titrait 300 à 500 unités et l'autre 800 à 1.000 unités anti-hémolytiques (tableau I). Vis-à-vis de la toxine vibron septique et de la toxine θ le sérum anti-*chauvæi* 9 manifeste un pouvoir anti-hémolytique plus élevé que le sérum normal correspondant. Le titre anti- θ du sérum anti-*chauvæi* 8 n'est pas supérieur à celui du sérum normal 8. Les deux sérums anti-*chauvæi* ne sont pas plus actifs que les sérums normaux vis-à-vis de la toxine *hæmolyticum*. A la dose

(5) En examinant les propriétés anti-hémolytiques des sérums prélevés depuis quarante-huit heures à cinq autres bœufs normaux, nous avons obtenu les résultats suivants : deux sérums contenaient 25 unités-*chauvæi*, 25 à 50 unités anti-vibron septique et 10 à 25 unités anti- θ . Un sérum possédait moins de 5 unités anti-*chauvæi* ; il titrait 100 à 150 unités anti-vibron septique et 5 à 10 unités anti- θ . Deux autres sérums titraient 30 et 40 unités anti-*chauvæi* ; ils présentaient un pouvoir anti-hémolytique extraordinaire à l'égard de l'hémolysine θ : en effet, 1/20.000 de centimètre cube de chacun d'eux neutralisait 65 D. H. d'hémolysine θ ; l'un des deux manifestait aussi une très forte activité anti-hémolytique vis-à-vis de la toxine vibron septique ; il suffisait, en effet, de 1/4.000 de centimètre cube de ce sérum pour neutraliser 20 D. H. de toxine ; il fallait 1/100 de centimètre cube de l'autre pour produire le même effet. Fait curieux à signaler, le vieillissement a rapidement et profondément modifié ces 2 sérums au point de vue de leur pouvoir anti-hémolytique à l'égard de l'hémolysine θ , puisque, deux mois après les premiers titrages, il fallait 0,002 cm³ de l'un des deux et 0,02 cm³ de l'autre pour neutraliser 65 D. H. de toxine θ . Après ces deux mois de conservation à la température de 2°, il a fallu 0,02 cm³ du premier au lieu de 1/4.000 de centimètre cube pour neutraliser 20 D. H. de toxine vibron septique. Pendant que le pouvoir anti-hémolytique du premier subissait une telle atténuation vis-à-vis de l'hémolysine θ et de la toxine vibron septique, son pouvoir anti-*chauvæi* ne variait pas d'après les déterminations des titres anti-hémolytique et anti-léthal.

de 0,2 cm³, ils ne neutralisent pas 20 D. H. de staphylolysine α ni 10 D. H. de streptolysine S.

3° *Sérums traités par les solvants des lipides.* — a) *Propriétés des sérums après une extraction de courte durée.* — Chaque sérum est traité selon le procédé I précédemment décrit. Après ce traitement, les sérums *normaux* 238 et 9 ont encore un léger pouvoir anti-hémolytique vis-à-vis de l'hémolysine θ , mais ils ne neutralisent pas, même à la dose de 0,2 cm³, 20 D. H. de toxine *chauvœi* ou de toxine vibrion septique. Par contre, après la même extraction, le sérum anti-*chauvœi* 238 possède un pouvoir anti-hémolytique très marqué non seulement à l'égard de la toxine *chauvœi*, mais encore vis-à-vis de la toxine vibrion septique et vis-à-vis des 4 hémolysines oxydables suivantes : θ , téta-nolysine, histolysine et pneumolysine ; ainsi, d'après le tableau IV, 0,0025 cm³ de ce sérum neutralisent 20 D. H. de toxine *chauvœi* ; 0,005 cm³ neutralisent 20 D. H. de toxine vibrion septique. On voit dans le tableau V que 1/2.250 de centimètre cube de sérum inhibe 65 D. H. de toxine θ ; 1/1.200 de centimètre cube neutralise 20 D. H. de téta-nolysine fraîchement préparée (6) et d'histolysine ; 1/80 de centimètre cube inhibe 15 D. H. de pneumolysine. Faisons remarquer que ce pouvoir anti-hémolytique à l'égard des toxines oxydables est plus intense que celui du sérum normal prélevé au cheval 238 avant l'immunisation (tableau V). Il est intéressant de noter en passant que la délipidation diminue considérablement (de vingt fois) le pouvoir anti-hémolytique du sérum normal 238 sur la pneumolysine ; le même procédé de délipidation annule le léger pouvoir anti-hémolytique que le sérum normal 9 exerce sur cette hémolysine. Ces observations révèlent l'influence des lipides sur le pou-

(6) Dans un travail antérieur, nous avons signalé que le titre anti-hémolytique d'un sérum anti-*perfringens* vis-à-vis d'un échantillon donné de toxine *perfringens* liquide ne dépend pas de l'état d'oxydation ou de réduction de cet échantillon [6]. Nous avons constaté ici que la téta-nolysine oxydée et la téta-nolysine additionnée de cystéine sont neutralisées par la même quantité de sérum anti-*chauvœi* délipidé ; ex. : 0,6 cm³ d'une toxine tétanique âgée de six semaines sont neutralisés par 1/800 de centimètre cube du sérum anti-*chauvœi* délipidé, que le titrage soit fait en l'absence de cystéine ou en présence de ce réducteur ; or, 0,6 cm³ de la toxine utilisée représentent 20 D. H. en l'absence de cystéine et 200 en présence de cystéine. Au cours d'un autre essai du même ordre, nous avons ajouté à l'échantillon de toxine tétanique précédent non plus un sérum anti-*chauvœi*, mais un sérum anti-tétanique ; le titrage a montré qu'il fallait davantage de sérum pour neutraliser la toxine tétanique activée par la cystéine que pour neutraliser la toxine non activée ; en effet, il a fallu 0,0005 cm³ du sérum anti-tétanique pour neutraliser la toxine + cystéine et il a suffi de 0,00025 cm³ du même sérum pour inhiber la toxine non additionnée de cystéine. Nous poursuivons ces recherches.

TABLEAU IV. — Action de différents sérums sur 3 hémolysines non oxydables. Activité des sérums avant et après un court traitement par les solvants des lipides (procédé I).

NUMÉRO et nature du sérum	DATE de la saignée	POUVOIR ANTI-HÉMOLYTIQUE VIS-A-VIS DE LA					
		toxine <i>chauvœi</i>		toxine vibrien septique		staphylolysine α	
		sérum non délipidé	sérum traité	sérum non délipidé	sérum traité	sérum non délipidé	sérum traité
217 anti- <i>chauvœi</i> . .	7-1-49	500-750				< 5	
238 normal	11-12-47	40	< 5	25	< 5	20	5 à 10
238 anti- <i>chauvœi</i> . .	7-3-48	1.000				10 à 25	
238 anti- <i>chauvœi</i> . .	24-9-48	1.000	400-500	400-600	200		5 à 10
238 anti- <i>chauvœi</i> . .	29-10-48	1.500				10 à 25	
9 normal	26-4-48	40	< 5	30-40	< 5	< 5	
9 anti- <i>chauvœi</i> . .	24-9-48	300-500	80	160	90	< 5	
8 anti- <i>chauvœi</i> . .	24-9-48	800-1.000	400	440	50-60		
648 anti- <i>chauvœi</i> . .	7-1-49	1.500-2.000				10 à 25	
GG2 anti-gangréneux.		40	< 10	300	< 10	2 à 5	2 à 5
302 normal	16-1-48					2 à 5	
304 normal	16-1-48					< 2	
305 normal	16-1-48					2 à 5	
307 normal	16-1-48					2 à 5	

voir inhibiteur des sérums normaux à l'égard de la pneumolysine.

Les sérums anti-*chauvœi* 8 et 9, après extraction par le procédé I possèdent une très faible activité anti- θ et un notable pouvoir anti-hémolytique à la fois contre les toxines *chauvœi* et vibrien septique (tableau IV).

Après avoir constaté que trois sérums anti-*chauvœi*, après un court traitement à l'alcool-éther, neutralisent encore l'effet hémolytique de la toxine vibrien septique et que l'un d'entre eux est très efficace en outre vis-à-vis de quatre hémolysines oxydables (tableau V), nous nous sommes demandé si une extraction plus prolongée que celle qui avait été faite jusqu'ici ne ferait pas disparaître les propriétés anti-hémolytiques non spécifiques des sérums anti-*chauvœi* et peut-être même leurs propriétés spécifiques.

b) *Propriétés des sérums après extraction prolongée par les solvants des lipides.* — Dans cette série de dosages nous n'avons utilisé que des toxines *chauvœi*, vibrien septique et θ . Le sérum anti-*chauvœi* 238, longuement traité par les solvants indiqués, neutralise encore les trois hémolysines énumérées. Son activité

TABEAU V. — Action des sérums normaux et anti-*chauvæi* sur quatre hémolysines oxydables. Activité des sérums avant et après un court traitement par les solvants des lipides (procédé I).

NATURE du sérum	NUMÉRO DE L'ANIMAL SAIGNÉ	DATE de la saignée	POUVOIR ANTI-HÉMOLYTIQUE VIS-A-VIS DE							
			l'hémolysine θ		l'histolysine		la tétanolysine		la pneumolysine	
			sérum non délipidé	sérum traité	sérum non délipidé	sérum traité	sérum non délipidé	sérum traité	sérum non délipidé	sérum traité
Normal . . .	238	11 déc. 1947.	40-60	40		250		400-500	200	
Anti- <i>chauvæi</i> .	238	24 sept. 1948.	200-300	225-250		1.200	4.000	1.200-1.600	800	800
Normal . . .	9	26 avr. 1948.	5-10	1-2	200	< 5	2 500	< 2,5	25-50	
Anti- <i>chauvæi</i> .	9	24 sept. 1948.	80-100	2-5		5	50.000	20-25		
Normal . . .	8	26 avr. 1948.	80-100						100-250	
Anti- <i>chauvæi</i> .	8	24 sep. 1948.	60						100	

anti-hémolytique vis-à-vis des toxines *chauvæi* et vibron septique reste comparable à celle que nous avons observée après une brève extraction. Quant au pouvoir anti- θ , il baisse légèrement ; il faut alors 1/1800 de centimètre cube de sérum pour neutraliser la dose d'épreuve de toxine θ .

RECHERCHES SUR LA NOCIVITÉ *in vivo* DE LA TOXINE *chauvæi*.

Il est bien connu que la toxicité des cultures *chauvæi* dépend non seulement de la souche employée, mais encore du milieu ensemencé. On sait aussi que la toxine *chauvæi* provoque la mort des souris et des cobayes normaux en quelques minutes lorsqu'elle est injectée par voie veineuse (7).

TOXICITÉ DES CULTURES *chauvæi* CENTRIFUGÉES. — Deux de nos souches bovines de *Cl. chauvæi* élaborent, en vingt-deux heures à 37°, dans certains bouillons Vi peptonés à 5 p. 1.000 et glucosés à 2 p. 1.000, une quantité importante de toxine ; en effet, après centrifugation, les cultures faites avec ces bouillons peuvent, à la

(7) D'après nos observations, 2 cobayes vaccinés contre le charbon symptomatique, et ayant effectivement résisté à 2 D. M. de culture *chauvæi* introduites sous la peau, succombent aussi rapidement que des cobayes normaux à l'injection intraveineuse de 2 D. M. de toxine *chauvæi*.

dose de 1/60 et même 1/80 de centimètre cube, tuer instantanément les souris de 17 à 20 g. ; en ensemençant l'une quelconque de ces deux souches dans d'autres bouillons VI, peptonés et glucosés comme les précédents, nous n'avons pas décelé de toxine foudroyante dans les cultures âgées de vingt-deux heures : en effet, après centrifugation, elles ne tuaient pas les souris à la dose intraveineuse de 0,5 cm³ ; cependant, le développement à 37° était abondant, les cultures centrifugées vingt-deux heures après l'ensemencement avaient le même pH (5,2 à 5,6) et une forte activité hémolytique. Signalons en passant que ces cultures centrifugées contenaient souvent 500 D. H. par centimètre cube, ce qui montre que 250 D. H. de toxine *chauvœi*, introduites dans le torrent circulatoire, ne sont pas mortelles pour la souris (8). Nous nous sommes rendu compte en outre que l'hémolysine de ces préparations non nocives pour la souris traverse les bougies L 2 et L 3.

ULTRAFILTRATION DE LA TOXINE *chauvœi*. — Au début de notre exposé nous avons signalé que nous avons ultrafiltré plusieurs préparations de toxine *chauvœi* sur des membranes de cellophane dont le diamètre des pores était égal à 4,5 m μ , 10 et 21 m μ ; nous avons donné les résultats que nous avons obtenus en comparant l'activité hémolytique des filtrats, des résidus de filtration et des toxines témoins. Au cours de ces recherches, nous avons examiné les filtrats, les résidus et les témoins, non seulement au point de vue de leur activité hémolytique *in vitro*, mais encore au point de vue de leur nocivité en injection intraveineuse à des souris de 17 à 20 g. Aucun des filtrats n'a tué la souris à la dose de 0,5 cm³. Les résidus de filtration et les toxines témoins étaient de nocivité comparable. La substance létale de la toxine *chauvœi* ne traverse donc pas les membranes employées.

ATTÉNUATION SPONTANÉE DE LA TOXINE *chauvœi*. — Pendant la conservation à la température de 2°, la toxine *chauvœi* s'atténue plus ou moins rapidement ; ainsi, une de nos préparations contenant 15 D. M. par centimètre cube aussitôt après la centrifugation était incapable, après quarante-huit heures de séjour au frigidaire à 2°, de tuer les souris à la dose de 0,5 cm³. D'autres préparations qui titraient 10 D. M. au début contenaient encore 5 D. M. par centimètre cube cinq jours plus tard et 2 D. M. douze jours après

(8) M. Weinberg et M. Nasta ont attiré l'attention sur les désordres graves causés par les toxines très hémolytiques de *W. perfringens*. Dans les expériences de Prigge (1936), de J. Ipsen et R. Davoli (1938), l'hémolysine θ provoque la mort des souris lorsqu'elle est injectée en grande quantité ; c'est un fait que nous avons observé aussi. Nous avons constaté, en outre, que 315 D. H. de cette hémolysine ne suffisent pas en injection intraveineuse pour tuer les souris [8].

la préparation ; certains de nos autres échantillons de toxine contenaient initialement 25 D. M. par centimètre cube ; elles renfermaient 5 D. M. par centimètre cube le treizième jour et n'étaient plus toxiques à la dose de 0,5 cm³ lorsque nous les avons examinées trente jours après le premier titrage.

A la température du laboratoire (18-20°), certains de nos échantillons de toxine *chauvœi* présentent déjà une atténuation au bout de vingt-quatre heures. D'autres restent stables pendant un jour ou deux, puis leur activité fléchit ; exemple : deux toxines contiennent 15 D. M. aussitôt après la centrifugation et vingt-quatre heures plus tard ; le troisième jour, leur titre est seulement de 6 D. M. par centimètre cube ; une de ces toxines conservées comparativement à 2° contient 8 D. M. par centimètre cube le troisième jour après la centrifugation.

EFFET DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES SUR LA TOXINE *chauvœi*. — Dans nos expériences, l'adrénaline s'est montrée incapable d'atténuer la toxine *chauvœi*. Par contre, le suc pancréatique kinasé a nettement diminué, en une heure, à 37°, la nocivité de la toxine *chauvœi* précipitée par le sulfate d'ammonium. Dans les mêmes conditions expérimentales, ce suc kinasé augmente considérablement l'activité de la toxine *perfringens* de type D [14]. Nous avons en outre constaté que la pepsine commerciale diminuait le titre des toxines *chauvœi*.

D'après nos essais, le cholestérol inhibe la substance létale de la toxine *chauvœi* précipitée par le sulfate d'ammonium. Pour établir ce fait, nous avons préparé une solution de toxine à 0,5 p. 100 dans de l'eau physiologique ; à 5 cm³ de cette solution toxique nous avons ajouté 0,25 mg. de cholestérol (0,1 cm³ d'une solution de cholestérol à 0,25 p. 100 dans de l'alcool à 90° B.). Les titrages, faits vingt minutes plus tard par voie intraveineuse, ont montré que pour tuer les souris il fallait injecter un volume de solution cholestérolée contenant 0,8 mg. de toxine ; par contre, il suffisait d'injecter 0,2 mg. de toxine sans cholestérol pour tuer les souris. Nous avons vérifié que 0,1 cm³ d'alcool dans 5 cm³ d'une solution de toxine à 0,5 p. 100 n'influçait pas la nocivité.

En déterminant l'activité hémolytique de la solution de toxine + cholestérol nous avons constaté que 0,8 mg. de toxine additionnée de cholestérol contiennent 90 D. H. Ainsi que nous l'avons vu, cette quantité d'hémolysine est insuffisante pour déterminer la mort des souris.

La lécithine possède également un pouvoir inhibiteur sur la toxine *chauvœi*. En utilisant, dans les mêmes conditions que le cholestérol, de la lécithine non purifiée de soja, nous avons constaté qu'il fallait 0,6 mg. de toxine additionnée de lécithine pour tuer les souris.

Ainsi que nous allons le voir, les sérums non délipidés possèdent à un haut degré le pouvoir de neutraliser *in vitro* le constituant léthal de la toxine *chauvæi*.

INHIBITION DE L'ACTION LÉTHALE
DE LA TOXINE *chauvæi* PAR LES SÉRUMS.

Kerrin (1934), Weinberg et Davesne (1935) ont constaté que de nombreux sérums normaux neutralisent la toxine *chauvæi* [25]. D'après Mason (1936), cette toxine n'est très efficacement neutralisée que par l'antitoxine homologue et par le sérum des moutons ayant reçu des inoculations d'anatoxine vibriion septique [21]. Davoli (1940) considère aussi que l'antitoxine vibriion septique neutralise la toxine *chauvæi* [3]. Deux ans avant, Uenaka avait émis l'opinion contraire [24].

Pour évaluer l'activité anti-*chauvæi* de nos sérums, nous avons recherché le plus petit volume de sérum qui supprime l'action léthale de vingt doses mortelles (D. M.) de toxine *chauvæi*. Chaque mélange de toxine et de sérum est injecté à des souris de 17 à 20 g., par voie veineuse, quarante-cinq minutes après sa préparation. La toxine utilisée dans ces titrages est une toxine précipitée par le sulfate d'ammonium et desséchée.

Avant délipidation, les sérums normaux, même à dose très faible, neutralisent la toxine *chauvæi*. Ainsi, le sérum normal 238, à la dose de 1/300 de centimètre cube, neutralise la toxine employée ; les sérums normaux 8 et 9 sont efficaces à la dose de 1/800 de centimètre cube. Après une courte extraction par l'alcool-éther, les sérums normaux sont inactifs à la dose de 0,2 cm³.

Les sérums anti-*chauvæi* provenant d'animaux ayant reçu de nombreuses inoculations de culture *chauvæi* peuvent naturellement, de même que les sérums normaux, supprimer la nocivité de la toxine *chauvæi*, mais, alors que les sérums normaux sont dépouillés de cette propriété après une courte extraction par l'alcool-éther, les immunsérums anti-*chauvæi* en sont encore pourvus après un tel traitement : par exemple, le sérum anti-*chauvæi* 238 qui a été traité par le procédé I, est capable, à la dose de 1/70 de centimètre cube, de neutraliser 20 D. M. de toxine *chauvæi*. Il en est de même du sérum anti-*chauvæi* 238 traité par le procédé II. Ajoutons que ce sérum ne neutralise pas, à la dose de 0,2 cm³, deux D. M. de toxine vibriion septique ; avant délipidation, il ne supprimait pas non plus la nocivité de l'exotoxine de *Cl. septicum*. Ces données montrent une fois de plus une différence fondamentale entre les constituants léthaux des toxines *chauvæi* et vibriion septique.

Les sérums anti-*chauvæi* 8 et 9 délipidés par le procédé I neutralisent à la dose de 0,1 cm³ 20 D. M. de toxine *chauvæi*.

Le sérum anti-gangréneux GG 1, avant délipidation, neutralise 5 D. M. de toxine *chauvœi* à la dose de 1/400 de centimètre cube : après délipidation par le procédé I, il ne neutralise pas, à la dose de 0,2 cm³, 5 D. M. de cette toxine ; il titre alors, d'après les dosages sur souris, 150 unités anti-vibron septique, 150 unités anti-*œdematiens*, 20 unités anti-histolytiques, 40 unités anti-*perfringens* α (tableau III). Malgré sa forte teneur en antitoxine vibron septique, il se comporte donc, vis-à-vis de la toxine *chauvœi*, comme un sérum normal délipidé.

Le sérum anti-gangréneux GG 2 non délipidé est capable, à la dose de 1/400 de centimètre cube, de neutraliser 20 D. M. de toxine *chauvœi* ; il titre 200 unités anti-vibron septique, 140 unités anti-*perfringens* α , 60 unités anti-histolytique et 40 à 50 unités internationales anti-*œdematiens*. Après extraction ménagée des lipides, il est inactif sur la toxine *chauvœi* (il ne neutralise pas, à la dose de 0,2 cm³, 5 D. M. de cette toxine) ; il titre alors 170 unités anti-vibron septique, 160 unités anti- α , 35 à 40 unités anti-histolytiques, 40 unités anti-*œdematiens*. Ceci constitue donc un nouvel exemple de sérum qui, tout en étant riche en antitoxine vibron septique, est incapable de neutraliser une quantité notable de toxine *chauvœi*. Après une extraction prolongée du sérum par l'éther, les propriétés anti-vibron septique, anti- α , anti-histolytique et anti-*œdematiens* sont manifestes (tableau III).

Un sérum anti-*perfringens*, un anti-vibron septique et un anti-*œdematiens* ont été purifiés par digestion pepsique ou fractionnés en euglobulines et pseudoglobulines par la méthode de G. Sandor. L'activité anti-*chauvœi* que possède la fraction de Pope des sérums digérés est nettement inférieure à l'activité anti-*chauvœi* exercée par les pseudoglobulines et par les sérums non traités ; ceci permet de supposer que la fraction de Pope est moins riche en lipides que les pseudoglobulines.

DISCUSSION.

Les sérums normaux et les sérums anti-histolytiques, avant délipidation, neutralisent l'effet hémolytique de la toxine vibron septique ; ils ne possèdent plus cette propriété après délipidation. Ces observations mettent en évidence que les lipides jouent un rôle important dans le phénomène de la neutralisation du constituant hémolytique de la toxine vibron septique par les sérums envisagés.

Des sérums anti-*chauvœi* délipidés de la même manière que des sérums normaux sont doués d'un pouvoir anti hémolytique très net vis-à-vis de la toxine vibron septique ; la première déduction qui vient à l'esprit en présence de ce fait est que les immunosérums considérés contiennent des *anticorps* capables de neutraliser l'hémo-

lysine du vibrion septique. Si tel est le cas, il doit exister une parenté entre l'hémolysine du *chauvœi* et l'hémolysine du vibrion septique. Mais il est possible que la liaison entre les lipides et les protéides sériques soit plus stable dans les immunosérums anti-*chauvœi* que dans les sérums normaux et, par suite, que l'effet anti-hémolytique exercé sur la toxine vibrion septique par les sérums anti-*chauvœi* traités par les solvants des lipides soit simplement dû à la présence d'un reste suffisant de lipides ; des recherches sont nécessaires pour décider si cette hypothèse est à retenir ou à rejeter.

Nous avons vu que la cystéine augmente l'activité de quelques toxines *chauvœi* préparées depuis un certain temps et que plusieurs échantillons de sérum anti-*chauvœi*, prélevés à des dates différentes à l'un des chevaux hyperimmunisés, présentent vis-à-vis de l'hémolysine θ , de l'histolysine, de la tétanolysine et de la pneumolysine un pouvoir inhibiteur plus élevé que celui du sérum normal fourni par le cheval avant toute immunisation. Ces faits tendent à montrer que le *Cl. chauvœi* élabore parfois une hémolysine oxydable capable de susciter la formation d'une 'anti-hémolysine active sur les hémolysines oxydables.

L'hémolysine non oxydable de la toxine *chauvœi* n'est pas inhibée par les sérums anti-*perfringens* riches en antitoxine α , mais seulement par les sérums anti-*chauvœi* ; même après délipidation par les procédés que nous avons employés, les sérums anti-*chauvœi* neutralisent l'hémolysine *chauvœi* non oxydable.

De nombreux sérums non délipidés suppriment l'action léthale de la toxine *chauvœi*. Après délipidation, les sérums non spécifiques sont inefficaces sur cette toxine ; par contre, la délipidation, telle que nous l'avons pratiquée, laisse persister une partie du pouvoir antitoxique des sérums anti-*chauvœi* ; les lipides conditionnent donc intégralement l'activité antitoxique des sérums non spécifiques. Il serait intéressant de rechercher si l'action prolongée des solvants des lipides sur les sérums spécifiques ne parviendrait pas finalement à faire disparaître l'affinité de ces sérums sur la toxine *chauvœi* et si l'addition expérimentale d'un lipide rétablirait leur activité antitoxique. Il conviendrait ensuite de déterminer si les sérums non spécifiques délipidés puis additionnés d'un lipide se comportent vis-à-vis de l'action léthale de la toxine *chauvœi* tout autrement que les sérums anti-*chauvœi*. Il faudrait simultanément examiner les diverses propriétés anti-hémolytiques des mêmes sérums.

POUVOIR AGGLUTINANT.

Pour évaluer le pouvoir agglutinant des sérums, nous préparons extemporanément des cultures du germe à étudier : des tubes de bouillon Vf sont ensemencés puis portés à l'étuve à 37°-38°

pendant vingt-deux à vingt-quatre heures ; les cultures sont centrifugées et le culot microbien est mis en suspension dans de l'eau physiologique. Ensuite, des doses décroissantes du sérum à titrer sont réparties dans des tubes dans lesquels sont ensuite ajoutés 2,5 cm³ de suspension microbienne. Tous ces tubes, ainsi que les tubes témoins (microbes sans sérum), sont alors placés dans une étuve à 37°-38° ; ceux qui contiennent des *Cl. chauvæi* sont sortis au bout de une heure quinze d'étuve, laissés à la température du laboratoire pendant deux heures, puis examinés. Les tubes contenant des *Cl. septicum*, *histolyticum* ou *sporogenes* sont laissés pendant quatre heures à l'étuve puis à la température du laboratoire jusqu'au lendemain ; ils sont examinés à la sortie de l'étuve et le lendemain. Le tube contenant la plus petite quantité de sérum capable de déterminer une agglutination légère mais nette indique le titre du sérum. Si par exemple, 0,05 cm³ de sérum dilué à 1 p. 100, c'est-à-dire 0,0005 cm³ de sérum, détermine une agglutination dans 2,5 cm³ d'une suspension microbienne, 1 cm³ de cette suspension contient $\frac{0,0005}{2,5} = \frac{1}{5.000}$ de cm³ du sérum employé ; le titre agglutinant de ce sérum est noté égal à 5.000.

a) TITRAGE EN PRÉSENCE DE *Cl. chauvæi*. — Avant délipidation, le titre agglutinant du sérum équin anti-*chauvæi* 238 s'élève à 60.000 ; après extraction prolongée, il est égal à 40.000. Le sérum du bœuf normal 8 titre 50 avant délipidation. Le sérum anti-*chauvæi* du bœuf 8 titre 2.500 avant délipidation et 1.000 après extraction par le procédé I (9).

Le sérum anti-gangréneux polyvalent GG 2 titre 25 avant délipidation comme après extraction prolongée. Ce titre agglutinant est comparable à celui de différents sérums normaux. Les trois sérums anti-vibron septique 1424, 307, 414 que nous avons examinés avant délipidation n'ont pas agglutiné plus efficacement la souche de *Cl. chauvæi* utilisée dans ces expériences que certains sérums normaux de cheval. Nous indiquerons, dans le paragraphe suivant, le titre agglutinant de quelques-uns de ces sérums vis-à-vis de *Cl. septicum* (souche Feuntun). Les sérums anti-vibron septique examinés proviennent tous de chevaux immunisés contre les antigènes élaborés par la souche Feuntun.

b) TITRAGE EN PRÉSENCE DE *Cl. septicum*. — Avant et après extraction prolongée, le titre agglutinant du sérum anti-*chauvæi*

(9) Dans les expériences de Horsfall et Goodner [48], la délipidation supprime les propriétés agglutinantes des sérums équins anti-pneumococciques de type I ; elle ne fait que diminuer celle des sérums de lapins anti-pneumococciques du même type.

238 est égal à 100 et celui du sérum anti-gangréneux GG 2 à 2.500.

Nous avons titré en même temps quelques sérums normaux et des sérums anti-vibron septique. Avant toute inoculation le sérum de cheval normal 307 avait un titre agglutinant inférieur à 25 ; le sérum anti-vibron septique prélevé au cheval 307 après des injections répétées de toxine vibron septique avait un titre agglutinant compris entre 50.000 et 75.000. Celui du sérum anti-vibron septique 414 est de 75.000.

Le sérum anti-vibron septique 307 a été fractionné en euglobuline I, euglobuline It, euglobuline IIA, euglobuline IIB, et en pseudoglobuline (10). Le titre agglutinant des euglobulines I et It est respectivement de 500 et 300 ; celui de la pseudoglobuline est très élevé : il est égal à 50.000.

Une autre portion du même sérum a été soumise à une digestion pepsique ; la fraction de Pope de ce sérum a comme titre agglutinant 50.000.

La valeur antitoxique de ces différentes fractions a été déterminée en présence d'une toxine vibron septique précipitée par le sulfate neutre d'ammonium ; d'après les titrages sur souris, l'euglobuline I titre 1 unité antitoxique, l'euglobuline It, 0,2 à 0,5 ; la pseudoglobuline et la fraction de Pope 125 à 150 unités.

ACTIVITÉ DES SÉRUMS FORMOLÉS ET CHAUFFÉS.

Tous les résultats déjà rapportés ont été obtenus en titrant des sérums non formolés et non chauffés. Au cours d'un autre travail, nous avons titré, sur la proposition de M. Lemétayer, des sérums anti-coli avant et après chauffage. Les observations que nous avons faites nous ont engagées à rechercher aussi l'influence du formolage et du chauffage sur les diverses propriétés de 12 autres immunsérums. Nos essais ont porté sur 2 sérums anti-*perfringens*, 2 anti-*chauvæi*, 2 anti-vibron septique, 2 anti-histolytiques, 2 anti-*cedemaliens* et 2 anti-*sporogenes*. Tous ces sérums proviennent de chevaux, sauf un qui est d'origine bovine (sérum anti-*chauvæi*).

Dans toutes les expériences, les sérums ont été formolés à 1 p. 3.000 (1 cm³ de formol à 40° B. dans 3.000 cm³ de sérum), puis chauffés pendant une heure dans un bain-marie à 56°.

Afin que nos observations soient faites dans les meilleures conditions, les sérums non traités ont été titrés en même temps que

(10) G. Sandor appelle euglobuline I le précipité que l'on obtient lorsqu'on dialyse du sérum pendant vingt-quatre heures, à la glacière, contre de l'eau distillée ; l'euglobuline It est séparée après trois jours de dialyse ; l'euglobuline IIA est précipitée à pH 6-6.2 en présence d'acide acétique et l'euglobuline IIB à pH 5,2-5,4. Les pseudoglobulines sont précipitées par 34 p. 100 de sulfate d'ammonium.

les sérums formolés et chauffés. L'évaluation du titre de chaque immunsérum est faite en présence de l'antigène homologue.

SÉRUMS ANTI-*perfringens*. — Le titre anti-lécithinasique α des sérums anti-*perfringens* a été déterminé *in vitro* en présence de sérum humain et de Ca, suivant la technique que nous avons indiquée [40]. Les résultats du tableau VI indiquent que le forme-

TABLEAU VI. — Titres anti- α et anti- θ de 2 sérums anti-*perfringens* non formolés et non chauffés. Titres après formolage à 1 p. 3.000 et chauffage pendant 1 heure à 56°.

SÉRUM	TITRE recherché	PROCÉDÉ de titrage	SÉRUM non traité (unités internationales)	SÉRUM formolé et chauffé (unités internationales)
562	Anti- α	<i>In vivo</i>	350	325-350
	Anti- α	<i>In vitro</i>	350-400	325
	Anti- θ	<i>In vitro</i>	2.000	2 000
1.202	Anti- α	<i>In vivo</i>	140-160	140-160
	Anti- α	<i>In vitro</i>	125-150	125-150
	Anti- θ	<i>In vitro</i>	550	450

lage et le chauffage diminuent légèrement le titre d'un sérum et n'influencent pratiquement pas celui de l'autre.

Le titre anti- α a été déterminé aussi *in vivo*. L'un des sérums titre 350 unités avant tout traitement et entre 325 et 350 unités après formolage et chauffage. L'autre sérum titre entre 140 et 160 unités anti- α , avant comme après le traitement. Ces chiffres montrent que le formol et le chauffage, dans les conditions indiquées, modifient peu les propriétés antitoxiques *in vivo* des deux sérums examinés.

Le titre anti- θ du premier de ces sérums n'est pas modifié par le formolage et le chauffage ; celui du deuxième est diminué de 20 p. 100 environ.

SÉRUMS ANTI-*chauxxi*. — Les sérums non traités et les sérums formolés et chauffés ont été titrés le même jour en prenant la précaution d'utiliser pour le titrage la même suspension microbienne ; nous insistons sur ce fait, car, souvent, le titre agglutinant d'un sérum vis-à-vis d'une souche donnée varie beaucoup avec la date de la préparation de la suspension des germes de cette souche. Pour faire cette suspension, il suffit d'ajouter de l'eau physiologique aux microbes obtenus en centrifugeant une culture âgée de vingt-deux à vingt-quatre heures.

Le formolage et le chauffage diminuent de 35 p. 100 environ le titre agglutinant d'un sérum anti-*chauvœi* de bovin et de 28 p. 100 environ celui d'un sérum anti-*chauvœi* de cheval. Ces deux traitements consécutifs ne modifient pas la valeur antihémolytique des 2 sérums. L'un d'eux titre 1.100 et l'autre 2.000.

SÉRUMS ANTI-VIBRION SEPTIQUE. — Le formolage et le chauffage diminuent respectivement de 40 et de 33 p. 100 le titre agglutinant des sérums anti-vibron septique 307 et 414. D'après les titrages sur souris, ces deux traitements ne modifient pas appréciablement la valeur antitoxique du premier sérum et n'abaissent que de 15 p. 100 environ celle du deuxième sérum (tableau VII).

TABLEAU VII. — **Activité de différents sérums non formolés et non chauffés. Activité après formolage à 1 p. 3.000 et chauffage pendant 1 heure à 56°.**

SÉRUM	TITRE agglutinant du		TITRE antitoxique du	
	sérum tel quel	sérum formolé et chauffé	sérum tel quel	sérum formolé et chauffé
Anti-vibron septique 307. . . .	50.000	30.000	160-175	160-175
Anti-vibron septique 414. . . .	75.000	50 000	250	200-225
Anti-histolytique 557.	4.000	2.500	200-225	175-200
Anti-histolytique 391.	2.000	1.200	225-250	200-225
Anti-œdémateux 383.			400	350-400
Anti-œdémateux 699.			200	200
Anti-sporogènes 314.	20.000	20.000		
Anti-sporogènes. 312.	40 000	40.000		

Chaque sérum est titré en présence de l'antigène homologue.

SÉRUMS ANTI-HISTOLYTIQUES. — Le titre agglutinant des 2 sérums est diminué de 35 p. 100 environ par le formolage et le chauffage ; le titre antitoxique déterminé sur souris subit seulement une diminution moyenne de 8 à 11 p. 100.

Signalons, en passant, que les agglutinines contenues dans les sérums anti-histolytiques accompagnent les pseudoglobulines et qu'on en retrouve une proportion comparable à celle des antitoxines dans la fraction résistante de Pope.

SÉRUMS ANTI-*sporogènes*. — Le pouvoir agglutinant des deux sérums examinés n'a pas été influencé par le chauffage et le formolage.

SÉRUMS ANTI-œdémateux. — Le formolage et le chauffage atténuent de 6 p. 100 environ l'activité antitoxique d'un sérum et ne modifient pas celle du deuxième sérum examiné.

CONCLUSIONS.

Contrairement à la toxine *perfringens* α , les toxines *chauvœi*, vibrion septique, *hæmolyticum*, staphylococcique α et streptococcique S sont très hémolytiques à pH 6,5, en présence de phosphates ; la pneumolysine, de même que l'histolysine et l'hémolysine θ , est également très hémolytique dans l'eau physiologique phosphatée (titrages en présence d'hématies lavées de mouton).

Les cultures de *Cl. chauvœi* contiennent toujours en quantité importante une hémolysine non oxydable ; parfois, elles renferment une hémolysine oxydable.

L'hémolysine non oxydable de *Cl. chauvœi* traverse les bougies 1.3. Elle ne traverse pas les membranes de cellophane dont le diamètre moyen des pores est égal à 4,5 μ , 10 ou 21 μ (ultrafiltration sous pression).

Les membranes de cellophane de 4,5 μ et même de 29 μ ne laissent pas passer l'hémolysine de la toxine vibrion septique ultrafiltrée sous pression.

Les antitoxines α et θ des sérums anti-*perfringens* ne suppriment pas plus l'effet hémolytique des toxines *hæmolyticum*, *œdémateux* A, staphylococcique α , streptococcique S, que celui des toxines vibrion septique et *chauvœi*.

Les inoculations répétées d'anatoxine histolytique au cheval permettent d'obtenir des sérums qui sont très fortement anti-hémolytiques non seulement vis-à-vis de la toxine histolytique mais encore vis-à-vis de la tétanolysine et de l'hémolysine *perfringens* θ . De tels sérums anti-histolytiques sont incapables de neutraliser la staphylolysine α .

Les inoculations de culture *chauvœi* au cheval et au bœuf déterminent régulièrement la formation d'une anti-hémolysine active sur l'hémolysine non oxydable de *Cl. chauvœi* ; cette anti-hémolysine est inefficace sur la staphylolysine α , sur la streptolysine S, sur l'hémolysine *perfringens* θ ainsi que sur les toxines *œdémateux* et *hæmolyticum*. L'activité anti- α des sérums anti-*chauvœi* est inférieure à une unité.

Exceptionnellement, les sérums anti-*chauvœi* sont plus actifs qu'un sérum normal sur les hémolysines oxydables. La délipidation diminue considérablement et parfois même annule le pouvoir inhibiteur des sérums normaux sur la tétanolysine, sur l'histolysine et sur la pneumolysine.

Les sérums anti-*chauvœi* délipidés possèdent la propriété de

supprimer l'effet hémolytique de la toxine vibron septique ; les sérums normaux délipidés n'ont pas cette propriété.

Avant délipidation, les sérums normaux, de même que les sérums anti-gangréneux, sont capables de supprimer l'action léthale de la toxine *chauvæi* : après délipidation, ils n'ont plus cette aptitude. Par contre, les sérums anti-*chauvæi* délipidés par le même procédé neutralisent la toxine *chauvæi* (titrage sur souris). Le procédé de délipidation employé ne fait pas disparaître l'activité antitoxique des sérums anti-gangréneux vis-à-vis des toxines *perfringens*, vibron septique, histolytique et *œdematiens*.

Les sérums anti-*chauvæi* délipidés agglutinent fortement les suspensions de *Cl. chauvæi*. Le pouvoir agglutinant des sérums anti-*chauvæi* formolés et chauffés est plus faible que celui des sérums non traités.

Le formolage et le chauffage affaiblissent davantage le pouvoir agglutinant que l'activité antitoxique des sérums anti-vibron septique et anti-histolytique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CÉLAREK (J.) et FEDGIN (B.). *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 133 ; 1937, **126**, 137.
- [2] COTONI (L.) et CHAMBRIN (N.). *Ces Annales*, 1928, **42**, 1536.
- [3] DAVOLI (R.). *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, 1940, **19**, 602.
- [4] DELAUNAY (M.), GUILLAUMIE (Maylis) et DELAUNAY (A.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 16.
- [5] GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 1941, **67**, 389.
- [6] GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 1942, **68**, 84 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 140.
- [7] GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 434, 452, 479 et 783.
- [8] GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 1944, **70**, 148.
- [9] GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.) et FABRE (M.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 12.
- [10] GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.) et FABRE (M.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 384.
- [11] GUILLAUMIE (M.) et BÉCOULET (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 142.
- [12] GUILLAUMIE (M.), FABRE (M.) et BÉCOULET (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 335.
- [13] GUILLAUMIE (M.) et KRÉGUER (A.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 189.
- [14] GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.) et FABRE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 911.
- [15] HARDY (W. B.) et GARDINER (S.). *J. Physiol. ; Proceed. physiol. Soc.*, 1910, **40**, 68.
- [16] HARTLEY (P.). *Brit. J. exp. Path.*, 1925, **6**, 180.
- [17] HEWITT (L. F.). *Biochem. J.*, 1927, **21**, 216.
- [18] HORSFALL (F. L.) et GOODNER (K.). *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 485.
- [19] KAMEN (L.). *Centralb. Bakt.*, 1904, **35**, 554 et 686.

- [20] KRÉGUER (A.) et GUILLAUMIE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 813.
- [21] MASON (J. H.). *The Onderstepoort J. veter. Sci.*, 1936, **7**, 433.
- [22] NEILL (J. M.). *J. exp. Med.*, 1926, **44**, 199 et 215.
- [23] TODD (E. W.). *Brit. J. exp. Path.*, 1941, **22**, 172.
- [24] UENAKA (S.). *Zeitsch. Immunitätsf.*, 1938, **93**, 236.
- [25] WEINBERG (M.) et DAVESNE (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1412.

ANTI-EXOTOXINES ET ANTICORPS ANTI-BACTÉRIENS

par G. SANDOR.

(Institut Pasteur. Service de Chimie physique.)

Dans une note préliminaire nous avons énoncé que les exotoxines ont un profil immunologique distinct des endotoxines [4]. Dans la présente communication nous allons montrer qu'effectivement l'organisme du cheval produit des anticorps différents vis-à-vis des exotoxines d'une part, et vis-à-vis d'autres antigènes bactériens que nous pourrions qualifier d'endotoxiques. En réalité, le terme « endotoxine » est impropre, puisque nombre de ces derniers antigènes bactériens ne sont pas toxiques. Il en est ainsi pour les polyosides pneumococciques et méningococciques, pour le glutamyle-polypeptide charbonneux, pour l'antigène capsulaire des bacilles pesteux, etc. Toutefois, qu'ils soient toxiques ou non, tous ces principes possèdent un caractère commun qui les distingue simultanément des exotoxines vraies. Ils sont produits par un groupe de bactéries distinctes de celles qui secrètent ces dernières. Les exotoxines vraies, douées de très haute toxicité vis-à-vis de l'espèce sensible, sont les produits de sécrétion des nécroparasites (Bail). Ce sont les bacilles diphtérique et gangréneux principalement, qui vivent aux dépens de tissus morts. Les antigènes endotoxiques, par contre, sont synthétisés par des bactéries pathogènes, qui peuvent se développer au sein même de tissus vivants. On comprend alors que les aptitudes réactionnelles de ces deux groupes d'antigènes soient distinctes. L'organisme animal, lors de l'évolution phylogénique, a forgé ses mécanismes de défense anti-infectieuse, dont les anticorps. Et ces derniers, dès lors, ne sont pas dirigés contre des protéides ou des polyosides quelconques, mais contre les antigènes des parasites suivant les caractères pathogènes spécifiques de ces derniers. C'est ainsi que l'on comprend pourquoi il y a des anti-exotoxines, d'une part, et des anticorps anti-bactériens, d'autre part, alors que toute classification des anticorps suivant la nature chimique des antigènes est impossible [4].

Et l'attribut, antibactérien, se justifie simultanément. En effet, la plupart des anticorps qui se forment à l'égard des bactéries interviennent directement contre ces dernières. Ce sont soit des précipitines-agglutinines-tropines, soit des ambocepteurs-opso-

nines [2, 3]. Dès lors, ils sont « antibactériens ». Par contre, les antitoxines sont uniquement des antidotes. Toute leur action immunologique s'épuise dans la neutralisation d'une toxine diffusible.

TRAVAUX PERSONNELS. — Pour les diverses techniques employées nous renvoyons à nos publications antérieures [2, 3, 4]. Rappelons simplement l'essentiel des fractionnements isoélectriques et de la méthode d'obtention de la « fraction résistante de Pope ».

FRACTIONNEMENT PAR DIALYSE ET PRÉCIPITATIONS ISOÉLECTRIQUES. — Environ 50 cm³ de sérum sont dialysés contre l'eau distillée pendant douze à dix-huit heures. Le précipité séparé constitue l'euglobuline I. La dialyse est continuée pendant deux jours encore, puis le sérum dilué au quart du volume du sérum de départ, enfin amené à pH 6,2 à l'aide d'acide acétique dilué. L'ensemble des précipités obtenus constitue l'euglobuline II A. A pH 5,4 on obtient un troisième précipité, l'euglobuline II B. Les eaux-mères sont neutralisées et les pseudoglobulines précipitées par le sulfate d'ammonium à 34 p. 100.

MÉTHODE STANDARD D'OBTENTION DE LA FRACTION RÉSISTANTE DE POPE. — A 50 cm³ de sérum on ajoute 25 cm³ d'un tampon acétate M/10 de pH 4, 0,500 g. de pepsine titrant 500 dissous dans une quantité adéquate d'eau, un mélange d'acide chlorhydrique N/5 et d'eau en quantité suffisante pour amener à pH 4 et à 150 cm³. On digère pendant trente minutes à 37-39°, puis on ajoute 18 g. de sulfate d'ammonium et 0,250 g. de pepsine titrant 500. On chauffe une heure à 58°. Le coagulum est éliminé par centrifugation. Les eaux-mères sont neutralisées, puis les globulines précipitées par 18 p. 100 de sulfate d'ammonium. Le précipité est repris dans l'eau distillée et dialysé pendant quarante-huit heures contre l'eau distillée. Un abondant coagulum est éliminé et la solution rendue isotonique.

Dans ces conditions on n'élimine pas la totalité des protéides dénaturés, mais les activités antitoxiques sont maintenues quasi intégralement. Nous avons appelé les protéides ainsi obtenus la « fraction résistante de Pope [5] ».

RÉSULTATS OBTENUS. — Dans le tableau ci-après nous avons réuni l'ensemble de nos résultats obtenus avec un très grand nombre d'immunsérums de cheval (tableau I).

Pour comprendre la signification de ce tableau, il faut l'analyser en détails.

Sous la rubrique : « Sérums antibactériens obtenus par la voie intraveineuse », nous avons réuni des sérums d'animaux immunisés par des bactéries mortes ou vivantes d'une part, et par des

TABLEAU I. — Les trois fonctions humorales de l'immunité.

	ACTIVITÉS P. 100				
	Euglobuline I	Euglobuline II A	Euglobuline II B	Pseudo-globulines	Fraction de l'opoe
1° Sérums anti-bactériens obtenus par la voie intraveineuse :					
Anti-pestueux	~ 90	5 à 10	0	5 à 10	0
Anti-méningococcique	~ 90	5 à 10	0	5 à 10	0
Anti-pneumococcique	~ 90	5 à 10	0	5 à 10	0
Hémolytique anti-mouton	~ 10	~ 60	~ 10	~ 20	0
2° Sérums anti-bactériens obtenus par la voie sous-cutanée :					
Anti-gonococcique	~ 10	~ 60	~ 10	~ 20	0
Anti-charbonneux	90	5 à 10	0	5 à 20	0
Anti-anatoxine pesteux	0	~ 50	0	~ 50	0
3° Anti-pseudoglobulines du sérum de cochon (voie sous-cutanée)	~ 10	< 4	0	~ 100	~ 30
4° Sérums antitoxiques obtenus par la voie sous-cutanée :					
Anti-venimeux	0	0	0	~ 80	~ 70
Anti-diphthérique	0	0	0	~ 80	~ 70
Anti-tétanique	0	0	0	~ 80	~ 70
<p>Nous publierons bientôt une note concernant les sérums anti-gangréneux. Dès à présent nous pouvons affirmer qu'au moins trois parmi eux, les sérums anti-vibron septique, anti-cedematens et anti-histolyticus, se comportent comme les trois autres sérums anti-toxiques relatés dans ce tableau.</p> <p>~, environ.</p>					

érythrocytes d'autre part. Pour les premiers, les résultats obtenus se rapportent indifféremment au pouvoir agglutinant et au pouvoir protecteur. Ce fait a été établi par nous en ce qui concerne les sérums antipesteux. Pour les sérums antipneumococciques et anti-méningococciques nous n'avons étudié que les pouvoirs agglutinants spécifiques du type. Mais, pour ces types de sérum il y a une relation entre ces derniers et les pouvoirs protecteurs [6, 7].

Dans tous les exemples étudiés par nous les agglutinines étaient simultanément des précipitines du type antibactérien (sérums antipesteux et antipneumococciques [8]). Il y a tout lieu de croire qu'il s'agit d'une règle générale pour ce genre d'immunsérums et qu'en réalité nous avons un type d'anticorps unique : précipitine-agglutinine-tropine [2, 3].

Le sérum hémolytique anti-mouton définit un autre type d'anticorps. Celui-ci, il est vrai, agglutine aussi, mais son activité principale s'exerce dans la déviation du complément.

Nous voyons que si le premier type d'anticorps accompagne l'euglobuline I, fraction la moins soluble des protéides sériques, le deuxième est supporté principalement par une fraction de solubilité intermédiaire (euglobuline II A).

Sous la rubrique : « Sérums antibactériens obtenus par la voie sous-cutanée », nous avons réuni un ensemble de sérums et d'activités fort disparates. Les sérums antigonococciques et anticharbonneux ont été obtenus par injection d'éléments figurés. Ceux-ci, en outre, étaient vivants dans le cas du sérum anticharbonneux (1). Le sérum anti-anatoxine pesteuse était obtenu par un antigène non figuré.

L'ambocepteur était l'unique anticorps étudié dans le sérum antigonococcique et nous ne connaissons pas les relations exactes qui existent entre cet anticorps et le pouvoir protecteur du sérum. Pour les sérums anticharbonneux nous n'avons étudié que les agglutinines et nous savons qu'il n'y a aucune relation entre celles-ci et le pouvoir protecteur, qui est supporté par un autre anticorps [9]. Pour le sérum anti-anatoxine pesteuse, seul est pris en considération dans le tableau le pouvoir protecteur.

Donc ici, exactement comme lors de l'immunisation par la voie intraveineuse, nous retrouvons les deux types d'anticorps supportés par les mêmes fractions protéidiques : le type précipitine-agglutinine-tropine, qui accompagne toujours l'euglobuline I, fraction protéidique la moins soluble du sérum, et le type ambocepteur-opsonine, attaché à l'euglobuline II A, fraction de solubilité intermédiaire. La séparation est absolument tranchée dans le cas des deux sérums obtenus à l'aide d'éléments figurés : antigonococciques et anticharbonneux. Le sérum obtenu par injection sous-cutanée d'anatoxine pesteuse est moins caractéristique. Ici, d'une part, seul figure le pouvoir protecteur et si, d'autre part, par la distribution de ce pouvoir parmi les diverses fractions protéidiques, ce sérum se range du côté du type ambocepteur-opsonine, il s'en écarte par une activité plus accusée de la fraction pseudo-globulinique.

Tous les sérums « antibactériens » possèdent deux caractères : les fractions euglobuliniques supportent toujours une proportion notable des activités et la fraction résistante de Pope est toujours complètement inactive.

Les sérums antitoxiques ont tous été obtenus par la voie sous-

(1) Rappelons que l'immunisation anti-charbonneuse, toujours faite à l'aide de bactériidies vivantes, est commencée par la voie sous-cutanée et terminée par la voie intraveineuse.

cutanée. Leur activité est évaluée par le test de neutralisation *in vivo*.

Nous voyons que tous ces sérums se caractérisent, d'une part, par l'inactivité totale des fractions euglobuliniques et, d'autre part, par le fait que la fraction résistante de Pope supporte une proportion notable de l'activité neutralisante. D'ailleurs cette proportion est remarquablement constante et s'écarte très peu de 70 p. 100 en moyenne.

Entre les sérums « antibactériens », d'une part, et les sérums « anti-exotoxiques », d'autre part, se situe le sérum antipseudoglobuline du sérum de porc obtenu par la voie sous-cutanée. Ce sérum, en effet, se rapproche des sérums anti-exotoxiques par le fait que la presque totalité de l'activité précipitante est supportée par les pseudoglobulines. Mais il s'en écarte parce que les euglobulines sont quand même sensiblement actives et que, d'autre part, la proportion de l'activité supportée par la fraction résistante de Pope est relativement faible (de 30 p. 100 au lieu de 70 p. 100). Remarquons que, ici encore, la précipitine du type antibactérien est supportée par l'euglobuline I tandis que la précipitation spécifique provoquée par les pseudoglobulines et la fraction résistante de Pope sont du type « antitoxique » [8].

SÉRUM HUMAIN. — Nous n'avons étudié jusqu'à maintenant que les isohémagglutinines, d'une part, et les sérums d'hommes atteints de fièvre typhoïde d'autre part.

Rappelons, au sujet des isohémagglutinines, que l'anti-Rh est toujours supporté par l'euglobuline I, tandis que les anti-A et B sont des propriétés sériques assez diffuses, mais qui ont une prédilection marquée pour l'euglobuline II A [10, 11].

Concernant les sérums d'hommes atteints de fièvre typhoïde, nous avons réuni les résultats dans le tableau ci-après (tableau II). Nous voyons que le taux de l'euglobuline II A augmente d'une manière considérable et les agglutinines H, comme O se répartissent parmi cette fraction et l'euglobuline I.

SÉRUM DE LAPIN. — Dans ce sérum il n'y a pas d'euglobuline I. Confirmant ce que Grabar [12] a publié à ce sujet en étudiant les caractères des réactions de précipitation, nous trouvons que pour ce sérum la répartition des anticorps entre euglobulines et pseudoglobulines n'a rien de caractéristique. Cette répartition possède ici un caractère purement aléatoire, contrairement à ce que nous avons pensé à un moment.

DISCUSSION. — Nous voyons que trois types d'anticorps peuvent être caractérisés dans le sérum de cheval et à chaque type

TABLEAU II. — Répartition des agglutinines "H" et "O" parmi les différentes fractions protéidiques dans les sérums d'hommes atteints de fièvre typhoïde.

NATURE DU SÉRUM	FRACTIONS PROTÉIDIQUES				
	Euglobuline I	Euglobuline II A	Euglobuline II B	Pseudo-globulines	Sérum
1° Sérums normaux :					
Ro...	2 p. 1.000	4 p. 1.000	3 p. 1.000	8 p. 1.000	
Cou...		3,4 p. 1.000	3 p. 1.000	10,9 p. 1.000	
Gi...	3,3 p. 1.000	3,9 p. 1.000	1 p. 1.000	12 p. 1.000	
2° Sérums typhoïdiques :					
Cos... C p. 1.000 . . .	0,9	8,3	1,6	9	
« O »	1/10	1/70	0	0	1/100
« H »	1/100	1/1.000	0	1/50	1/1.000
Arc... C p. 1.000 . . .	32	8,1	3	10,3	
« O »	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50
« H »	1/100	1/300	0	0	1/600
Mart... C p. 1.000 . . .	2,1	8,7	4,2	13,8	
« O »	1/200	1/100	0	1/60	1/200
« H »	1/1.000	1/300	0	0	1/1.000
Bi... C p. 1.000 . . .	1	10	2,4	14,2	
« O »	1/50	1/110	1/25	1/90	1/200
« H »	1/80	1/300	0	1/80	1/600

C, concentration; « O », agglutination somatique; « H », agglutination flagellaire.

revient un groupe d'antigènes de nature déterminée. Ces groupes d'antigènes, d'autre part, ne sont pas définis par des caractères chimiques simples, mais, principalement, par les aptitudes pathogènes spécifiques des bactéries qui les produisent.

Prenons, tout d'abord, les différents antiprotéides. Dans le tableau ci-après nous avons résumé l'essentiel de ce qui les concerne (tableau III) en nous servant de nos conclusions personnelles auxquelles nous avons joint celles obtenues par Faure, Lami et Coulon [13], d'une part, et par Heidelberger [14], d'autre part. Nous voyons que seules les anti-exotoxines se fixent toujours sur les pseudoglobulines, quelle que soit la voie d'introduction de l'antigène. Ce groupe d'anticorps est caractérisé encore par le fait qu'une proportion notable de l'activité est supportée par la

TABLEAU III. — Répartition des divers « anti-protéides » parmi les différentes fractions protéidiques du sérum de cheval suivant la nature et la voie d'introduction de l'antigène.

NATURE DE L'ANTIGÈNE	VOIE d'introduction	EUGLOBULINES	PSEUDO-GLOBULINES	FRACTION DE POPE (rendement) p. 100
1° Anti-anatoxine pesteuse .	Intraveineuse. Sous-cutanée.	+	+	0
2° Anti-nucléoprotéide pneumo-coccique (21)	Intraveineuse. Sous-cutanée.	+	0	
3° Anti-globulines sériques (nous-mêmes et 21)	Intraveineuse. Sous-cutanée.	+	0 ++	30
4° Anti-exotoxines (nous-mêmes et 20)	Intraveineuse. Sous-cutanée.	0 0	+	70

fraction résistante de Pope. D'ailleurs, cette proportion est remarquablement constante dans leur cas et ne s'écarte que très peu de 70 p. 100 en moyenne.

Le profil immunologique des exotoxines est donc nettement défini et les anti-exotoxines forment une véritable famille naturelle.

Dans les sérums antibactériens, les euglobulines sont toujours actives et la fraction de Pope toujours inactive. Si, en outre, l'immunisation a été opérée à l'aide d'éléments figurés, deux types d'immunsérums bien définis sont produits. Dans l'un des types l'anticorps s'attache principalement à l'euglobuline I et il est alors une précipitine-agglutinine-tropine, tandis que dans l'autre type il est supporté en majeure partie par l'euglobuline II A. Enfin, dans ce dernier cas, l'anticorps est du type : ambocepteur-opsonine [2, 3].

L'appartenance de l'anticorps antibactérien à ces deux types ne dépend pas de la voie de l'immunisation. Les érythrocytes injectés par la voie intraveineuse ont produit le même type d'anticorps que les gonocoques injectés par la voie sous-cutanée. L'immunisation sous-cutanée par les bactériidies charbonneuses a donné naissance à une précipitine-agglutinine-tropine, exactement comme l'introduction intraveineuse de méningocoques, de pneumocoques ou de bacilles pesteux.

Il ne pourrait donc s'agir que de quelque caractère des antigènes « endotoxiques ». Or, ce caractère n'est pas simple. En effet,

parmi les bactéries qui ont produit une précipitine-agglutinine-tropine nous trouvons un holoprotéide (antigène capsulaire de Schuetze [15], des bacilles pesteux [16]), un polypeptide particulier (glutamyle-polypeptide de Tomesik [17], des bactéricidies charbonneuses), un polyside pur (pneumocoques) et des polysides mélangés, peut-être, avec des protéides dans le cas des méningocoques [7]. Pourtant, éventuellement, tous ces antigènes possèdent un caractère commun : ils ne sont pas liés à des substances lipoidiques dans l'élément figuré (2).

Par contre, les deux antigènes « endo-toxiques » qui ont provoqué la formation d'anticorps supportés principalement par l'euglobuline II A, sont liés tous les deux à des substances lipoidiques dans l'élément figuré. Il en est ainsi pour les gonocoques dont l'endotoxine est manifestement un complexe de Boivin. Mais il est indiscutable que les hémolysinogènes aussi sont adsorbés par les substances lipoidiques qui constituent une forte proportion des stromas érythrocytaires.

Nous pourrions donc admettre comme hypothèse préliminaire que l'anticorps supporté par l'euglobuline I constitue une réponse spécifique à une endotoxine non lipoidique, tandis que celui qui s'attache à l'euglobuline II A est une anti-endotoxine lipoidique.

Nous ne pouvons pas dire comment les faits se présenteraient à la suite de l'injection d'un antigène endotoxique non figuré. Il se peut que dans ce cas la voie d'introduction joue aussi un rôle (3). Toutefois, l'exemple de la toxine pesteuse prouve que, quelle que soit cette voie, les euglobulines sont toujours actives et la fraction de Pope toujours inactive.

La durée de l'immunisation n'intervient pas dans nos exemples. Ainsi nous avons étudié certains sérums antipesteux pendant plus d'un an à plusieurs reprises sans que les caractères physico-chimiques des anticorps se modifient. D'ailleurs, Van der Scheer

(2) Le cas de méningocoques est discutable. Entre autres, Boor et Miller [18] ont isolé des complexes de Boivin à partir de ces bactéries. Mais il est non moins vrai que l'on en extrait très facilement d'emblée des polysides purs (Sharp et Rake, etc.). Il est donc possible que ces polysides soient dans ce cas moins fermement liés aux substances lipoidiques que dans les autres complexes de Boivin.

(3) L'antitoxine pesteuse accompagne l'euglobuline IIA et les pseudoglobulines lors de l'immunisation sous-cutanée. Le sérum alors n'est pas agglutinant. Nos services pratiques affirment que si l'immunisation à l'aide de l'anatoxine pesteuse est conduite par la voie intraveineuse, les sérums deviennent agglutinants et précipitants. Il est donc probable que l'anticorps accompagne dans ce cas l'euglobuline. I. P. Grabar et P. Corvazier ont étudié un sérum de cheval antityphoïdique obtenu par immunisation à l'aide de l'endotoxine de Boivin. L'anticorps serait une propriété sérique diffuse dans ce cas (communication personnelle).

et ses collaborateurs ont abouti à la même conclusion par l'étude électrophorétique [49].

Nos recherches concernant le sérum humain ne sont pas encore suffisamment avancées pour pouvoir tirer une conclusion définitive. Toutefois, nous pouvons dire que ce sérum est d'un type comparable à celui du cheval.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SANDOR (G.) et SKROBISZ (C.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 1041. — SANDOR (G.), LEMÉTAYER et NICOL. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1043.
- [2] SANDOR (G.). *Immunité Humorale*, conférence faite à la Société de Chimie biologique, séance du 1^{er} février 1949 (sous presse).
- [3] SANDOR (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 378. Congrès de Chimie biologique, Paris 1948 (sous presse).
- [4] SANDOR (G.) et SKROBISZ (C.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, **30**, 410.
- [5] SANDOR (G.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 157.
- [6] GAY et CHICKERING. *J. exp. Med.*, 1915, **21**, 389.
- [7] KABAT, MILLER, KAISER et FOSTER. *J. exp. Med.*, 1945, **81**, 1.
- [8] SANDOR (G.) et SKROBISZ (C.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 532.
- [9] STAUB et GRABAR. *Ces Annales*, 1942, **68**, 355.
- [10] WITEBSKY, MOHN, WOWLES et WARD. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1946, **61**, 1.
- [11] SANDOR (G.) et BESSIS (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 962 ; *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 376.
- [12] GRABAR. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 24.
- [13] FAURE, LAMI et COULON. *Ces Annales*, 1948, **74**, 19.
- [14] HEIDELBERGER. *J. exp. Med.*, 1947, **86**, 77, 95.
- [15] SCHUETZE. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 284, 289.
- [16] BAKER, FOSTER, SOMMER, MEYER et MEYER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **64**, 139.
- [17] TOMCSIK et SZONGOTT. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1933, **78**, 86.
- [18] BOOR et MILLER. *J. infect. Dis.*, 1944, **75**, 47.
- [19] VAN DER SCHEER et WYCKOFF. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1940, **43**, 427.

COMPORTEMENT D'UN BACTÉRIOPHAGE ACTIF SUR *Cl. WELCHII*

par A. GUELIN.

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage.)

Les recherches faites jusqu'ici sur les bactériophages des anaérobies sont peu nombreuses. Notons l'isolement du phage tétanique par Cowles en Amérique (1934). D'après un *Traité de Microbiologie* d'Aristovsky, Minkevitch et Frid, on apprend que les bactériophages actifs sur les germes de la gangrène gazeuse ont été isolés en U.R.S.S. en 1938-1940. Dans un article, Hauduroy (1946) mentionne le travail de Zaeva relatif à ce sujet. Jouralev, Kokine et Pokrovskaya (1944) ont appliqué avec succès ces phages, pendant la guerre, dans la prophylaxie et le traitement de la gangrène gazeuse. Enfin, en France, Kréguer, Guélin et Le Bris, en 1947, ont isolé un bactériophage actif sur *Cl. welchii*.

L'objet de ce travail est l'étude du comportement du bactériophage *perfringens* pendant sa multiplication. Les recherches peuvent être divisées en trois groupes : a) multiplication par rapport au temps ; b) multiplication par rapport à la quantité de bactéries ; c) multiplication par rapport à la quantité de bactériophage.

Le phage T, isolé en 1947 avec A. Kréguer et J. Le Bris, était malaisé à manipuler, en raison des difficultés à obtenir un titre élevé et de son action lytique incomplète. Nous avons utilisé un autre bactériophage isolé récemment, à l'aide d'une souche M de *Cl. welchii* (1). Le nouveau phage est très actif et son titre augmente rapidement. Ses plages rappellent celles du phage colidysentérique C 16 ; mais le moindre changement dans l'intensité de multiplication bactérienne a un retentissement immédiat sur les dimensions des plages, qui peuvent devenir soit assez volumineuses, soit extrêmement petites.

Les détails de la technique du titrage du bactériophage sur milieux solides seront donnés ultérieurement. Nous remercions vivement M^{lle} Le Bris qui a pris une part active à la mise au point de cette technique et assumé une grande partie du travail.

Nous exprimons aussi notre reconnaissance à M. Bardach qui,

(1) Cette souche a été isolée par A. Kréguer à partir de selles d'enfant.

avec des moyens réduits, a fait construire un thermostat à vide, grâce auquel les titrages des phages anaérobies sur milieu solide ont été rendus possibles.

a) MULTIPLICATION DU BACTÉRIOPHAGE ANAÉROBIE
PAR RAPPORT AU TEMPS.

En premier lieu, il était nécessaire d'établir quelle cadence suit l'augmentation du titre du bactériophage *perfringens* M, mis en contact avec la souche M de *Cl. welchii*. Pour cela, on a titré le bactériophage à des intervalles rapprochés pendant son développement.

Les expériences ont été faites de la manière suivante :

1° Obtention d'une culture de trois à quatre heures, avec 10 millions de bactéries par centimètre cube ;

2° Inoculation de cette culture avec le filtrat bactériophagique (dilué ou non et titré à l'avance), à raison de 1 cm³ de culture ;

3° Addition de 0,1 cm³ de glucose à 30 p. 100 pour 10 cm³ de culture ;

4° Bain-marie à 37° ;

5° Prélèvements de 0,05 cm³ à une, dix, quinze, vingt, vingt-cinq, trente, quarante, cinquante, soixante, quatre-vingts, quatre-vingt-dix, cent, cent vingt, cent cinquante minutes. Dans les expériences non suivies de lyse bactérienne, les titrages ont été continués jusqu'à trois, quatre, six, vingt-quatre heures. Chaque prélèvement est aussitôt dilué dans 10 cm³ d'eau peptonée glacée ;

6° Titrage de tous les prélèvements au bout de cent cinquante minutes (les plus tardifs sont titrés au fur et à mesure).

TABLEAU I. — Développement du bactériophage *perfringens* en présence du *Cl. welchii*.

TEMPS en minutes	QUANTITÉ de bactériophage par 0,05 cm ³	AUGMENTATION (par rapport au départ)	OBSERVATIONS
0	10.000		} La culture devient de plus en plus concentrée.
1	10.500		
10	4.800		
15	1.000		
20	1.200		
25	5.000		
30	52.000	5,2 fois.	} Trouble intense de la culture. Eclaircissement à peine perceptible. Fort éclaircissement. Eclaircissement complet. Eclaircissement complet. Eclaircissement complet.
45	2.610.000	261 —	
60	2.340.000	231 —	
80	300.000.000	30.000 —	
90	345.000.000	34.500 —	
100			
120	55.000.000	5.500 —	
150	56.000.000	5.600 —	

Généralement, dans les quinze ou vingt premières minutes après l'inoculation du bactériophage son titre diminue rapidement. Cette diminution est due probablement à la fixation des corpuscules sur les bactéries. Après vingt-cinq à trente minutes, le titre augmente brusquement pour atteindre son maximum au bout d'une heure, à condition d'introduire beaucoup de phage au départ. Avec les filtrats bactériophagiques fortement dilués cette augmentation n'a lieu que vers quatre-vingt-dix minutes environ. Après l'augmentation de son titre, la quantité de bactériophage diminue rapidement dans la culture lysée (tabl. I).

La souche de *Cl. welchii* utilisée dans nos expériences est extrêmement sensible à son bactériophage. Inoculée en quantité convenable, le phage provoque régulièrement, après une heure, la lyse de la culture qui s'éclaircit en l'espace de dix minutes. La croissance intense des bactéries et l'augmentation considérable du bactériophage précède cet éclaircissement, durant lequel la quantité du bactériophage ne subit pas de grands changements.

b) DÉVELOPPEMENT DU BACTÉRIOPHAGE *perfringens* PAR RAPPORT A LA QUANTITÉ DE BACTÉRIES.

Nous avons essayé de déterminer si l'augmentation du titre bactériophagique est influencée par la quantité de germes introduits au départ.

Dans ce but, une quantité constante de bactériophages a été introduite dans de jeunes cultures contenant chacune une quantité différente de bactéries. A la fin de l'expérience les titres des bactériophages ainsi obtenus ont été comparés.

La technique employée a été la suivante :

1° Préparation des suspensions bactériennes dans du bouillon glucosé, à partir d'une culture de quatre heures. Chaque suspension contenant une quantité différente de bactéries par centimètre cube, est préparée en double exemplaire ;

2° Inoculation des deux séries avec le bactériophage (1 : 10). Une série est inoculée avec 10.000.000 de corpuscules pour 0,05 cm³ ; la deuxième série reçoit 10 corpuscules pour le même volume de liquide ;

3° Bain-marie à 37° C ;

4° Au bout de deux heures, les tubes des deux séries sont refroidis dans l'eau glacée et titrés.

D'après nos résultats, l'importance de l'inoculum bactérien influence nettement le titre du bactériophage. Nous obtiendrons une meilleure augmentation de titre toujours entre certaines quantités de bactéries. Ces quantités ne sont pas fixes ; elles dépendent, elles aussi, de la quantité de bactériophage. Si l'on opère, d'une part, avec 10 corpuscules, et, d'autre part, 10 millions, il faudrait, chaque fois, des quantités différentes de bactéries.

Dans la première expérience (10 corpuscules), pour que le titre bactériophagique atteigne son maximum, il suffit de 250.000 à 300.000 germes ; tandis que dans le second cas, pour lequel la quantité de phages est beaucoup plus élevée (10 millions), le 1.000.000 de bactéries ne donne qu'une augmentation relativement faible du titre bactériophagique.

On peut donc conclure que pour obtenir le titre maximum du bactériophage, il faut davantage de bactéries si le nombre de corpuscules au départ est élevé. Mais cette quantité de bactéries sera un obstacle à l'augmentation du titre si les corpuscules sont peu nombreux au départ (tableau II).

TABLEAU II. — Développement du bactériophage *perfringens* en présence de différentes quantités du *Cl. welchii*.

QUANTITÉ de bactéries au départ (par 0,05 cm ³)	A 10.000.000 de corpuscules-phages par 0,05 cm ³ (au départ)		B 10 corpuscules-phages par 0,05 cm ³ (au départ)	
	Quantité de phages après 2 heures	Augmentation	Quantité de phages après 2 heures	Augmentation
5 000 . . .	590 000		0	
50 000 . . .	300.000		0	
100.000 . . .	1.980.000		4.600	460 fois.
200.000 . . .	21.000 000	2 fois.	2.400 000	240 000 —
300 000 . . .	50.000 000	5 —	11.640.000	1.164.000 —
500 000 . . .	63 000.000	6,3 —	1.400.000	140 000 —
700.000 . . .	99.000 000	9,9 —	192.000	19 200 —
1.000 000 . . .	300.000.000	30 —	38.000	3.800 —

c) MULTIPLICATION DU BACTÉRIOPHAGE *perfringens*

PAR RAPPORT A LA QUANTITÉ DE CORPUSCULES INTRODUITE AU DÉPART.

Il est intéressant de noter sur le tableau II l'intensité de la multiplication du bactériophage, c'est-à-dire le rapport entre son titre au début de l'expérience et son titre final. Avec 10 corpuscules de phages pour 0,05 cm³ de culture et en présence d'une quantité optimum de bactéries, il y a une augmentation considérable du bactériophage, allant jusqu'à un million de fois. Au contraire, dans les mêmes conditions, mais en partant de 10 millions de corpuscules au lieu de 10 par 0,05 cm³, il y aura une faible augmentation du titre bactériophagique ne dépassant pas quelques dizaines de fois la quantité initiale. On voit donc que, dans des conditions données, l'intensité de multiplication du bactériophage dépendra de la concentration du filtrat bactériophagique employé.

Afin de confirmer ces observations, nous avons fait une série

d'expériences dans lesquelles les différentes quantités de bactériophages ont été mises en contact avec une quantité toujours constante de bactéries. Soit 1 cm³ d'une des dilutions bactériophagiques, soit différentes quantités du filtrat non dilué, sont distribués dans des tubes contenant 8 cm³ de culture. Le liquide de chaque tube est ensuite amené à un même volume, par addition de bouillon. Addition de 0,1 cm³ de glucose (à 30 p. 100) par 10 centimètres cube de culture. Bain-marie à 37° pendant deux heures.

Après deux heures de bain-marie à 37° C, tous les tubes sont refroidis dans l'eau glacée et titrés en même temps. Les résultats qui figurent dans le tableau III sont la moyenne de 4 titrages et caractéristiques de toutes nos expériences.

D'après ces résultats, on voit qu'en présence d'une quantité

TABLEAU III. — Développement du bactériophage *perfringens* M à partir de différentes quantités de corpuscules-phages (la quantité de germes est la même partout).

QUANTITÉ DE CORPUSCULES-PHAGES par 0,05 cm ³		AUGMENTATION (par rapport au départ)
Au départ	Après 2 heures à 37°	
20.000 000	107.000.000	5,4 fois.
10.000 000	50 000.000	5 —
5 000.000	44.000.000	8,8 —
1.000.000	144.000.000	144 —
100.000	321 000.000	3.210 —
10.000	729.000.000	72.900 —
1.000	622 000.000	622.000 —
100	116.000 000	1.160.000 —
10	68 000.000	6.800.000 —

donnée de bactéries, l'intensité de la multiplication des corpuscules augmente à mesure que leur quantité initiale diminue. Cette augmentation peut être observée seulement jusqu'à un certain degré de dilution du filtrat bactériophagique, après quoi commence l'atténuation de la multiplication corpusculaire.

L'atténuation du développement est considérablement ralentie si on opère avec un bon milieu de culture. Même en présence d'une quantité constante de bactéries et de phages, les résultats varient avec la qualité du milieu. C'est avec le bouillon Vf préparé dans le Service des Toxines gangréneuses que nous avons obtenu les meilleurs résultats. Nous en remercions très sincèrement M^{lle} Guillaumie.

Comment peut-on expliquer le développement extrêmement

rapide du bactériophage quand il est pris en petite quantité au début de l'expérience ? Peut-on envisager que chaque corpuscule, avec son potentiel considérable de prolifération, exige, pour atteindre son titre le plus élevé, des conditions spécialement favorables : milieu et bactéries, et que, par conséquent, ce développement sera entravé d'autant plus vite que les corpuscules seront plus nombreux ? Nos expériences avec différentes quantités de bactéries confirment en partie cette hypothèse.

D'autre part, l'idée d'un ou plusieurs facteurs inhibant la croissance bactérienne ou la multiplication du bactériophage, contenus dans le filtrat, n'est pas négligeable. Déjà, d'Hérelle a noté que plus le milieu est riche en substances bactériennes dissoutes, moins la multiplication des bactériophages est active. Les fortes dilutions du filtrat bactériophagique pratiquées dans nos expériences peuvent diminuer l'action de ces facteurs antibactériens ou antiphagiques. Ce ne sont que des hypothèses qui demandent à être vérifiées expérimentalement.

Résumé : L'étude de la multiplication du bactériographe *perfringens* M en présence de *Cl. welchii* M nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

1° Durant les quinze à vingt premières minutes, le titre du bactériophage diminue, probablement parce que le phage se fixe sur les bactéries ;

2° Après ce délai, le titre bactériophagique s'élève brusquement et atteint son maximum entre la soixantième et la quatre-vingt-dixième minute environ. Ensuite, il diminue plus ou moins rapidement ;

3° La lyse de la culture survient lorsque le bactériophage a atteint une forte concentration. L'éclaircissement complet s'effectue en général en l'espace de dix minutes, après une heure à une heure et demie de culture. Durant l'éclaircissement de la culture le titre bactériophagique ne varie pas beaucoup ;

4° L'augmentation du bactériophage est en rapport direct avec la quantité de bactéries présentes. Un nombre plus grand de corpuscules au départ nécessite, pour que le titre se maintienne au voisinage du maximum, une quantité plus grande de bactéries ;

5° Pour une quantité donnée de bactéries, l'augmentation du titre sera beaucoup plus intense dans le cas d'une infection bactériophagique faible que dans celui d'une infection massive.

BIBLIOGRAPHIE

- ARISTOVSKY (V. M.), MINKEVITCH (J. E.) et FRID (S. M.). Traité de microbiologie médicale. Medguiz, Moscou, 1945.
COWLES (Ph.). *J. Bact.*, 1934, 27, 163.

- D'HÉRELLE (F.). *Le bactériophage et son comportement*, Masson, édit., Paris, 1926.
- HAUDUROY (P.). *La Presse Médicale*. 26 oct. 1946, p. 703.
- JOURAVLEV (P. M.), KOKINE (G. A.) et POKROVSKAYA (M. P.). *Microb. Epidem., Immunol.*, 1944, n° 9, 44.
- KREGUER (A.), GUELIN (A.) et LE BRIS J.). *Ces Annales*, 1947, 73, 1038.

ACTION DE L'ACRIFLAVINE SUR LES LEVURES

V. — LE SYSTÈME DES CYTOCHROMES DES MUTANTS

« PETITE COLONIE »

par PIOTR. P. SLONIMSKI et BORIS EPHRUSSI.

(Institut de Génétique du C. N. R. S.
et Institut de Biologie physico-chimique, Paris.)

INTRODUCTION.

Dans le mémoire précédent de cette série (Slonimski, 1949) il a été montré que les mutants « spontané » et « acriflaviné » de la levure de boulangerie, décelés par la petite taille de leurs colonies, différaient de la levure normale qui leur donnait naissance par l'absence de la respiration sensible au cyanure. L'un de nous a formulé l'hypothèse que cette anomalie physiologique était due à une déficience du système Warburg-Keilin.

Le présent travail, consacré à l'étude comparée des cytochromes des levures normales et mutantes, a été entrepris dans le but de vérifier cette hypothèse et éventuellement d'établir, avec toute la précision possible, le « point d'attaque » de la mutation « petite colonie ».

SOUCHES UTILISÉES.

Les souches suivantes ont principalement été utilisées :

B II : levure de boulangerie diploïde (*S. cerevisiae*), « grande » :

59 R : souche haploïde, « grande », isolée à partir de B II ;

59 RA et 59 Rp, deux mutants haploïdes (« petites ») de 59 R, l'un induit par l'acriflavine, l'autre spontané, respectivement.

L'origine de ces souches a été décrite dans le mémoire I.

A titre de comparaison nous avons, dans certains cas, étudié également : α) 4 souches haploïdes provenant d'une autre race de levure de boulangerie, *S. cerevisiae*, race « Yeast Foam », à savoir : 141 a « grande », 141 a-A « petite acriflavinée », 140-3 d « grande » et 140-3 d-A « petite acriflavinée », dont on trouvera l'origine dans le mémoire II ; β) la levure de boulangerie Springer, achetée à Paris et une levure de brasserie basse provenant de la brasserie Graff, de Rennes.

Les levures destinées aux expériences sont cultivées à 25°.

dans des boîtes de Petri, sur le milieu à l'eau de touraillons gélosé décrit par Ephrussi, Hottinguer et Chimènes (1949).

SPECTRES DES CELLULES INTACTES.

Les levures ayant proliféré pendant cinq à sept jours en boîtes de Petri sont recueillies et lavées trois fois par centrifugation dans KH_2PO_4 M/15. Après la dernière centrifugation, on décante le liquide surnageant et verse le culot sur du papier filtre. Il est alors facile de ramasser la levure en un gâteau compact que l'on

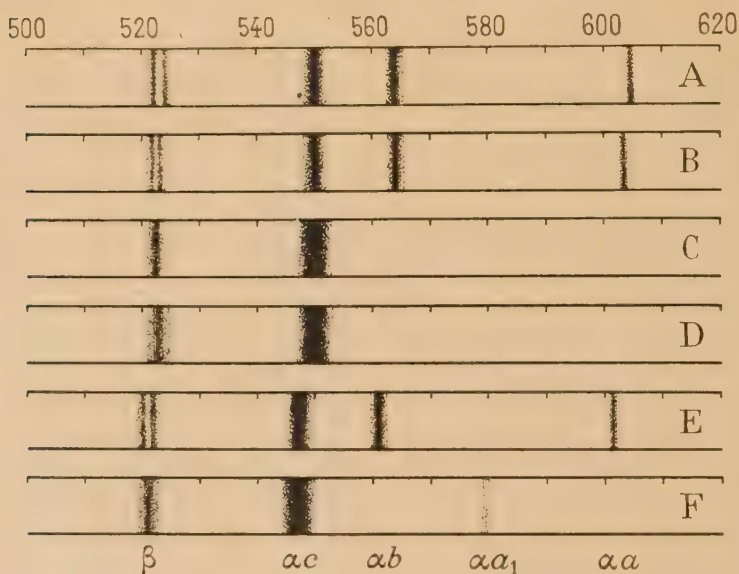


FIG. 1. — Spectres des cytochromes réduits de quatre souches de levure : Boulangerie du Commerce (a), 59R (b), 59RA (c), 59Rp (d). e et f : spectres des levures 59R et 59RA congelées dans l'azote liquide.

place, après avoir ajouté de l'hydrosulfite de Na, entre deux lames porte-objet, écartées l'une de l'autre par deux cales de 2 mm. d'épaisseur. La préparation ainsi obtenue est examinée au spectroscope de réversion de Hartridge. La source lumineuse fournie avec cet instrument nous ayant paru insuffisante, nous l'avons remplacée par la lampe ponctuelle de Zeiss.

La figure 1 (A, B, C, D) représente les spectres de 4 souches de levure (1).

(1) Notons en passant que les gâteaux des levures normales présentent une teinte brunâtre tandis que les gâteaux des levures mutantes (« petites ») sont légèrement rosés.

Il ressort clairement de l'examen de cette figure que les levures normales que nous avons étudiées présentent le spectre décrit par les auteurs (*Cf.* Keilin, 1933) chez la levure de boulangerie. Par contre, le spectre des « petites » en diffère nettement. On note en particulier l'absence des bandes des cytochromes *a* et *b*. Les positions des bandes α et β du cytochrome *c* sont normales, mais la bande α (550 $m\mu$) est beaucoup plus large et plus intense que la bande α de la levure normale 59 R dont dérivent ces « petites ».

Afin de préciser ces résultats, nous avons examiné les spectres des mêmes souches selon le procédé récemment décrit par Keilin et Hartree (1939) : examen spectroscopique de cellules congelées dans l'air liquide. Ces auteurs ont, en effet, montré sur des préparations de muscle cardiaque que les bandes des cytochromes apparaissent dans ces conditions avec plus de netteté et Keilin et Harpley (1941), appliquant ce procédé au *B. coli*, ont pu dissocier les bandes situées à 551 $m\mu$ et 559 $m\mu$ qui, à la température ordinaire, confluent en une seule bande b_1 (560 $m\mu$). Dans nos expériences, nous immergeons dans l'azote liquide des gâteaux de levure comprimés entre deux lames parallèles. Comme la figure 1 (E et F) permet de le voir, on constate dans ces conditions un déplacement des bandes des cytochromes vers les ondes courtes ; leurs positions deviennent : α c-5475 Å, α b-5605 Å, α a-6020 Å. En outre, on voit apparaître dans le spectre des « petites » une nouvelle bande très faible située à 5790 Å.

CYTOCHROME *c* DES « PETITES » ET DES « GRANDES ».

Malgré la position normale des bandes du cytochrome *c* de toutes les souches étudiées, nous nous sommes demandé si le cytochrome *c* des levures mutantes était bien identique à celui des levures normales. Nous l'avons donc extrait par un procédé qui ne diffère de celui de Keilin (1929) que par le fait que les filtrations sont remplacées par des centrifugations. Les quantités de réactifs utilisées sont proportionnelles à la quantité de levure. Les solutions brutes de cytochrome *c* (fraction A de Keilin) ainsi obtenues à partir de levures normales (59 R) et mutantes (59 RA) ont été examinées à l'aide du spectrophotomètre Beckman. Les courbes d'absorption trouvées sont reproduites dans la figure 2. On voit que les deux courbes sont parallèles et sont donc dues à la même substance. La différence entre les valeurs absolues des extinctions peut être due soit à ce que la teneur en cytochrome *c* des « petites » est plus grande que celle des « grandes », soit à ce que l'extraction n'est pas quantitative (et inégale dans les 2 cas), soit, bien entendu, aux deux facteurs à la fois. La différence observée entre les largeurs des

bandes α des « grandes » et des « petites » (fig. 1) plaide en faveur de la première interprétation. La justesse de celle-ci est confirmée par l'étude quantitative de l'intensité de ces bandes, réalisée par l'emploi d'une méthode de compensation des bandes essentiellement analogue à celle de Elliot et Keilin [1934] (2).

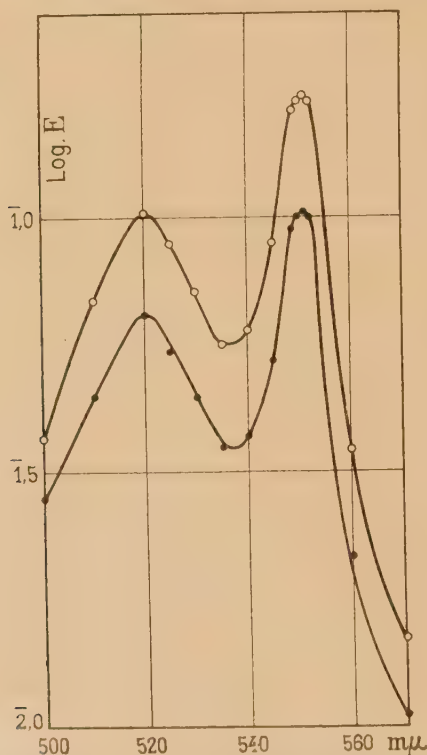


FIG. 2. — Courbes d'absorption des cytochromes c réduits extraits des souches 59R et 59RA. (Extraction de 5 g. (poids humide) de levure selon la technique de Keilin (1929). Volume final : 4 cm³. Epaisseur de cuve : 1 cm.)

Nous utilisons le microspectroscope de Leitz et deux sources lumineuses indépendantes, dont les intensités peuvent être variées.

(2) Nous ne donnons ici que les résultats du dosage par cette méthode. Nous avons bien essayé diverses techniques d'extraction du cytochrome c, mais la comparaison des chiffres ainsi obtenus avec ceux fournis par la méthode spectroscopique qui sera décrite nous a montré que l'extraction n'est jamais complète : nous avons réussi à extraire tout au plus 15 p. 100 du cytochrome. Nos rendements ont cependant été meilleurs que ceux obtenus par les auteurs (Fujita, Hata, Numata et Ajisaka, 1939).

L'un des faisceaux lumineux traverse la préparation à examiner (gâteau, d'épaisseur et de teneur en eau connues, de levure préalablement chauffée vingt minutes à 80° et réduite par l'hydro-sulfite de Na). L'autre traverse successivement (a) une préparation de levure irréversiblement oxydée par H_2O_2 après chauffage et ne présentant par conséquent aucune des bandes, et (b) une cuve contenant une solution de cytochrome *c* de concentration connue dans laquelle plonge l'objectif du microscope ; (a) est introduit afin d'avoir des deux côtés une diffusion de lumière analogue. La mesure est faite en faisant varier, jusqu'à égalité des bandes, l'épaisseur de la solution étalon, ce que l'on obtient par immersion plus ou moins profonde de l'objectif qui sert ainsi de deuxième face d'une cuve d'épaisseur variable. Le déplacement est déterminé par la lecture de la graduation de la vis micrométrique. Ce procédé, vérifié par la mesure des rapports des concentrations de deux solutions de cytochrome *c* pur, placées dans les deux faisceaux lumineux, donne des erreurs ne dépassant pas 10 p. 100.

Les dosages effectués de cette façon sur des levures ayant proliféré de trois à cinq jours en aérobiose ont fourni, pour le cytochrome *c* des différentes souches, les chiffres suivants (en p. 100 du poids sec) : B II-0,12 et 0,15 ; 59 R-0,12 et 0,14 ; 59 RA-0,20 et 0,24 ; 59 Rp-0,20 et 0,21. Les souches mutantes présentent donc une teneur en cytochrome *c* 1,6 à 1,7 fois plus grande que les souches normales (3).

Des résultats analogues ont été obtenus avec des souches dérivées de la levure américaine « Yeast Foam ». Les valeurs trouvées pour deux souches normales, 141 *a* et 140-3 *d*, sont respectivement 0,22 et 0,27 p. 100 ; celles trouvées pour les « petites acriflavinées » dérivées de ces deux souches : 0,42 et 0,41 p. 100. Quoique les valeurs absolues sont ici bien différentes des précédentes, les rapports des teneurs en cytochrome *c* des « petites » et des « grandes » sont du même ordre de grandeur (1,9 et 1,7).

INDOPHÉNOLOXYDASE.

Le test manométrique de l'activité de l'indophénoloxydase a été effectué selon la technique de Keilin (1929) sur des levures ayant proliféré dans des boîtes de Petri, c'est-à-dire en aérobiose, pendant trois jours. Le chlorhydrate de diméthylparaphénylènediamine a été préparé par M. Parrod. Ce réactif, comme le naphthol- α R.A.L., a été recristallisé deux fois.

Les résultats d'une expérience sont donnés par le tableau I.

(3) Les estimations de la teneur en cytochrome *c* des cultures plus vieilles (dix jours) des souches normales sont rendues difficiles par l'accumulation d'un pigment brunâtre qui gêne les déterminations.

Il permet de voir que les « petites », spontanées et acriflavinées, n'oxydent pas le réactif, tandis que les « grandes » (haploïdes et diploïdes) l'oxydent avec la même vitesse que la levure de boulangerie du commerce.

TABLEAU I. — Oxydation de 10 mg. de diméthylparaphénylènediamine (p.p.d.) par 2 cm³ de suspension de levure à 5 p. 100 (poids humide).

Température : 28° C. Tampon phosphate M/15, pH 7,4. Levure chauffée pendant quatre-vingt-dix minutes à 50° C.

Colonne 1 : autoxydation de p.p.d. en millimètres cubes.

Pour chaque souche sont indiquées les valeurs d'absorption d'O₂ en millimètres cubes :

En absence de p.p.d. (colonne 2).

En présence de p.p.d. (colonne 3).

Colonne D : oxydation de p.p.d. = colonne 3 — (2 + 1).

TEMPS en minutes	TÉMOIN	LEVURE du commerce			BII			59R			59RA			59R _p		
	1	2	3	D	2	3	D	2	3	D	2	3	D	2	3	D
15	0	10	60	50	19	72	54	21	74	53	0	2	2	0	1	1
30	1	21	113	90	41	134	95	40	136	95	0	4	3	0	5	4
45	2	30	154	122	59	181	125	59	186	125	1	6	4	0	9	7

Ces résultats sont confirmés par la réaction colorée du « Nadi » que nous avons effectuée selon la technique de Keilin. La réaction est toujours complètement négative chez les « petites » et positive chez les « grandes ».

Ces observations ont été étendues à une centaine de souches haploïdes, « grandes » et « petites », isolées à partir de « Boulangerie II » ou de « Yeast Foam ». Sur toutes ces souches nous avons effectué à la fois la détermination du quotient respiratoire (4) et la réaction du Nadi. Toutes les souches qui, d'après le Q R, ont été classées comme « petites », ont donné une réaction du Nadi complètement négative.

CYTOCHROME-OXYDASE ET OXYDASE SUCCINIQUE.

1° CYTOCHROME-OXYDASE DANS LES CELLULES INTACTES. — Keilin (1925) a montré que la bande du cytochrome c, située à 550 mμ, et montrée par une suspension de levure, disparaît lorsqu'on fait barboter de l'air dans la suspension. Ceci est dû à l'oxydation

(4) Dans les conditions où le sucre est le facteur limitant (cf. Slinninski, 1949).

du cytochrome *c*, dont la forme oxydée ne présente pratiquement pas de spectre reconnaissable. Le comportement de la bande située à 550 m μ . envers l'oxygène moléculaire permet donc la mise en évidence de l'activité de la cytochrome-oxydase dans les cellules intactes.

Nous avons pu constater que le passage d'air ou d'oxygène dans une suspension de levure normale dans du tampon phosphate M/15 provoque la disparition rapide de la bande située à 550 m μ . La même expérience, réalisée sur une suspension de levure mutante (souche 59 RA), donne un résultat entièrement différent : quelles que soient la durée et la vitesse du passage d'oxygène et la densité de la suspension, on observe continuellement le spectre du cytochrome *c* réduit. Ce test conduit donc à la conclusion que les levures mutantes ne peuvent pas oxyder leur cytochrome *c* par l'oxygène moléculaire. Ce cytochrome peut cependant être oxydé par des oxydants tels que l'H₂O₂ ou le ferri-cyanure de K.

2° CYTOCHROME-OXYDASE ET OXYDASE SUCCINIQUE DANS LES BROYATS.

— La démonstration de la cytochrome-oxydase dans un broyat ne contenant pas de cellules intactes est plus difficile dans le cas de la levure que dans celui du muscle. Keilin (1929) n'a pu obtenir, à partir de la levure de boulangerie, de préparation dépourvue de cellules intactes et présentant une activité de l'indophénoloxydase. La même difficulté a été rencontrée par Stier et Castor (1941) et ce fait les a empêchés de conclure, de façon sûre, à l'absence de cytochrome-oxydase dans la levure résistante au KCN qu'ils ont étudiée. Seul Chantrenne (1943), qui a fait appel à une microméthode, réussit à mettre en évidence une certaine activité de cytochrome-oxydase dans des broyats de levure.

D'un autre côté, Keilin et Harpley (1941) ont pu démontrer l'activité de l'oxydase succinique dans des broyats de levure. Ces broyats contenaient cependant encore les corps des cellules brisées.

Afin de pouvoir estimer l'activité enzymatique des souches normales en absence totale de respiration, nous avons cherché à mettre au point une technique permettant d'obtenir des broyats actifs totalement dépourvus d'éléments figurés. Le procédé auquel nous nous sommes arrêtés est le suivant :

Dans la *préparation de l'extrait* nous utilisons tout le long le tampon phosphate de Krebs (1940) à pH 7.4 (5). La levure,

(5) Remarquons que les extraits enzymatiques préparés dans le tampon phosphate M/15 à pH 7,4 sont beaucoup moins actifs, ce qui est probablement dû à l'absence de certains ions métalliques. Ce fait a déjà été observé par Schneider et Potter (1943) sur des broyats de foie.

cultivée en boîtes de Petri, est récoltée aseptiquement dans la solution tampon et est « inanitiée » en faisant passer dans la suspension, pendant douze à seize heures, un courant d'air (Cf. Słonimski, 1949). La levure est ensuite lavée trois fois par centrifugation, puis broyée pendant soixante minutes à l'aide de l'agitateur ultra rapide construit par J. W. Towers et C^o. Chaque flacon contient 5 g. de levure (poids humide), 15 cm³ de tampon et 50 g. de billes de verre. Le broyat est repris quantitativement par 10 cm³ de tampon et centrifugé pendant deux minutes à 1.800 tours. Le liquide surnageant est prélevé de façon à ne pas entraîner le culot et recentrifugé. La manipulation est répétée six fois. Ces manipulations, ainsi que le broyage, sont effectuées à froid (0° à 4° C). On obtient ainsi environ 10 cm³ d'extrait qu'on appellera fraction A et qui représente en poids 20 à 30 p. 100 de la suspension initiale. L'examen microscopique montre qu'elle est dépourvue de cellules. D'autre part, on constate qu'en présence de glucose elle n'absorbe pas d'oxygène.

Les déterminations de l'activité des deux systèmes enzymatiques : cytochrome-oxydase et succino-oxydase, sont effectuées par la méthode manométrique à 28° et pH 7,4 (appareil de Warburg). Les concentrations finales dans les fioles sont les suivantes : cytochrome *c* (The Treemond Sales C^o), $0,16 \times 10^{-4}$ M ; Hydroquinone RP deux fois recristallisée, 0,1 p. 100 ; Succinate de Na, M/30 ; Ascorbate de Na, M/75.

Le tableau II A et la figure 3 résument les résultats obtenus avec la fraction A des différentes souches. On y voit que cette fraction montre chez les « grandes » une nette activité cytochrome-oxydasique et succino-oxydasique, tandis que chez les « petites » elle est nulle.

Pour déterminer avec plus de précision les valeurs des QO_2 dans ces deux systèmes, nous avons utilisé la technique de Schneider et Potter (1943) qui permet, en employant trois quantités différentes de la préparation enzymatique (par exemple 0,1, 0,2 et 0,4 cm³), d'extrapoler la valeur de l'autoxydation du substrat en présence de l'enzyme. Celle-ci nous a fourni pour la fraction A des souches normales les valeurs du QO_2 de la cytochrome-oxydase 3,5 à 5, selon l'expérience, et pour l'oxydase-succinique 1,8 à 2,5. Les souches mutantes ne montrent aucune activité de cytochrome-oxydase ; leurs QO_2 sont même négatifs (— 2 à 3,5) : en présence de la préparation enzymatique l'autoxydation du substrat (acide ascorbique, par exemple), due à la présence du cytochrome *c*, est considérablement diminuée. Les valeurs trouvées pour le QO_2 de l'oxydase succinique des « petites » sont dans les limites des erreurs des déterminations manométriques.

La fraction A du broyat des souches normales montre donc une activité cytochrome-oxydasique nette. Mais les valeurs du

QO_2 sont beaucoup plus faibles que celles trouvées dans le cas du muscle cardiaque (Cf. Keilin et Hartree, 1938). On pouvait donc se demander si cette activité n'est pas due à une contamination par des ions métalliques. L'expérience suivante montre

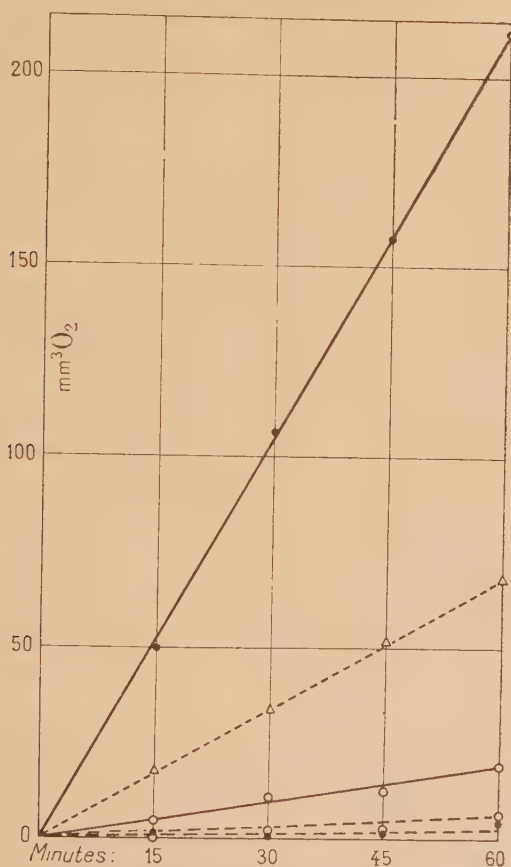


FIG. 3 — Oxydation de l'ascorbate de Na M/75 par les fractions A des broyats des souches 59R et 59RA. (30 mg. de poids sec de fraction A par fiole.) Points, 59R; cercles, 59RA. Trait plein, en présence de cytochrome *c* $0,16.10^{-4}M$; pointillé, sans cytochrome *c*; triangles, oxydation de l'ascorbate en présence de cytochrome *c*.

qu'il n'en est pas ainsi. En centrifugeant pendant trente minutes à 3.000 tours, on peut séparer la fraction A du broyat en 2 fractions : B (culot), qui correspond aux gros granules de Claude (1946), et C (liquide surnageant), qui contient les microsomes. Aussi bien chez les souches normales que chez les mutants la

fraction B représente environ 15 p. 100 du poids de la fraction A. En lavant la fraction B avec du tampon et en la recentrifugeant, on obtient des préparations enzymatiques plus actives qui montrent, chez les « grandes », les valeurs suivantes de QO_2 : pour la cytochrome-oxydase, 30 à 50, et pour l'oxydase succinique, 10 à 15. Chez les « petites », ni la fraction B ni la fraction C ne présentent aucune activité.

En outre, les résultats qui viennent d'être relatés suffisent, à notre avis, pour écarter l'hypothèse d'après laquelle la différence entre les deux types cellulaires se ramènerait à des différences dans la perméabilité à l' O_2 .

LES DÉHYDRASES SUCCINIQUE ET LACTIQUE.

On sait que toutes les déshydrogénases peuvent être classées en trois catégories d'après la nature de l'accepteur intermédiaire d'hydrogène qui assure la réaction avec l'oxygène moléculaire (Cf. Greene et Brosteaux, 1936 ; Bach, Dixon et Zervas, 1946). En rapport avec notre étude, le groupe de déhydrases qui réduisent le cytochrome nous intéresse particulièrement, car elles semblent réagir avec le cytochrome *c* directement, sans que l'addition des coenzymes soit nécessaire. Or, les études récentes des deux principaux représentants du groupe, des déhydrases succinique et lactique, font ressortir avec encore plus de clarté le lien intime qui unit le système des cytochromes à ces enzymes. Keilin et Hartree (1939-1945) et Stotz (1942) ont montré que dans les préparations du muscle cardiaque le cytochrome *b* est intimement associé à la déhydrase succinique et les recherches de Pappenheimer et Hendee (1947) prouvent que le cytochrome *b* est le facteur limitant de l'oxydation du succinate par les broyats de *Corynebacterium diphtheriae*. Récemment, Ball, Anfisen et Cooper (1947) et Slater (1948 *a*) ont démontré l'existence d'un facteur supplémentaire nécessaire pour la réduction du cytochrome *c* par le cytochrome *b*. Le problème de l'identité du cytochrome *b* avec la succinodéhydrase n'est certes pas encore résolu, mais il ne semble pas y avoir de doute qu'il joue le rôle d'intermédiaire entre le substrat et le cytochrome *c* (Cf. Ball, 1942). Une relation analogue a été observée par Bach, Dixon et Zervas (1946) en ce qui concerne la déhydrase lactique. Ces auteurs ont montré sur la levure que le « nouveau » cytochrome b_2 (bande α à 5565 Å) fait partie intégrante du complexe enzymatique qui catalyse la réaction entre le lactate et le cytochrome *c* (ou le bleu de méthylène). A cause de sa faible concentration, le cytochrome b_2 n'est pas visible dans les préparations ordinaires des levures. Mais sa présence peut être décelée dans les préparations enzymatiques hautement concentrées et purifiées.

Afin de compléter les renseignements que nous possédons sur la partie du système Warburg-Keilin réduisant le cytochrome *c* nous avons comparé l'activité des déshydrogénases lactique et succinique des broyats obtenus à partir de « grandes » et de « petites ».

Notre souche mutante étant dépourvue de cytochrome-oxydase, nous n'avons pas pu utiliser les méthodes de mesure de l'activité des déshydrogénases, fondées sur la détermination du système entier de l'oxydase succinique (Schneider et Potter, 1943) ou lactique. Nous avons donc eu recours aux méthodes mesurant l'absorption d'O₂ en présence de KCN, le bleu de méthylène servant d'accepteur d'hydrogène (Cf. Keilin et Hartree, 1940; Ball, Anfinsen et Cooper, 1947) et à la méthode de Quastel et Wheatley (1938) dans laquelle on mesure le dégagement du CO₂ en milieu bicarbonaté et en anaérobiose. D'autre part, nous avons effectué des déterminations de la décoloration anaérobie du bleu de méthylène suivant la technique classique de Thunberg (Cf. Umbreit, Burris et Stauffer, 1945).

Toutes ces méthodes ont donné des résultats concordants : pré-

TABLEAU II. — **Activité de la cytochrome-oxydase, succino-déshydrogène et lactico-déshydrogène, des fractions A et B de quatre souches de levure.**

Concentration des préparations en milligrammes de poids sec par centimètre cube. Fraction A : 59R-28; 59RA-27; 59Rp-23; BII-40. Fraction B : 59R-23; 59RA-20.

A, ascorbate M/75; B, bleu de méthylène M/1.000; C, cytochrome *c* 0,16.10⁻⁴M; H, hydroquinone 0,1 p. 100; K, KCN M/100; L, lactate M/30; S, succinate M/30.

	SUBSTRAT	TAMPON	MILLIMÈTRES CUBES D'O ₂ absorbé par préparation enzymatique à partir			
			de 59 R	de BII	de 59 RA	de 59 Rp
Fraction A (1) 0,5 cm ³ .	C		3	1	2	2
	A		1		2	
	A + C	32	62		19	
	S		15	18	10	7
	S + C	1	39	43	9	9
	K + C + S		2		4	
	K + C + S + B	3	19		10	
	K + C + B		0		14	
Fraction B (2) 0,3 cm ³ .	K + C + L		1		3	
	K + C + L + B	3	17		32	
	C		1		1	
	H		1		3	
	H + C	4	121		5	

(1) Durée de l'expérience manométrique : 30 minutes.

(2) Durée de l'expérience manométrique : 20 minutes.

sence dans l'extrait de souches normales de 2 déshydrases, succinique et lactique, et absence de la première dans les souches mutantes. Le tableau II résume les mesures manométriques dans une expérience de ce genre et les chiffres ci-dessus donnent les temps de décoloration de 0,5 cm³ de bleu de méthylène M/2.000 par 0,5 cm³ de fraction A (11 mg. poids sec) en présence de deux substrats (technique de Thunberg) :

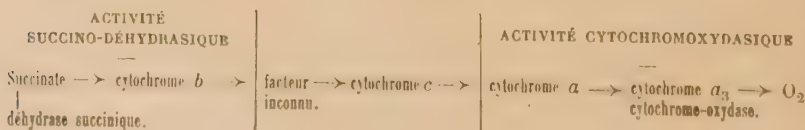
	59R	59RA
Tampon pH = 7,4	> 6 heures.	> 6 heures.
Lactate M/30	45 minutes.	3 minutes.
Succinate M/30	100 minutes.	> 6 heures.

Sans vouloir aborder le problème des liens existant entre les fractions sédimentables à environ $3.000 \times G$ et $18.000 \times G$ et les ferments respiratoires, problème qui fera l'objet d'une prochaine étude, nous voudrions faire remarquer que : 1° la déshydrase succinique et la cytochrome-oxydase se trouvent surtout dans la fraction B des « grandes » ; 2° l'activité de cette fraction (QO_2) est augmentée par les lavages au tampon ; 3° la déshydrase lactique se trouve surtout dans la fraction qui ne sédimente pas même à $18.000 \times G$ environ et les extraits des souches mutantes présentent une valeur de cette activité supérieure à celle des extraits provenant de souches normales.

Nos expériences confirment entièrement les résultats de Chantrenne (1943) en ce qui concerne l'association de la cytochrome-oxydase et la succino-déshydrase avec les granules submicroscopiques et l'absence de cette association pour la déshydrase lactique chez la levure. On peut cependant remarquer que les QO_2 de la cytochrome-oxydase et succino-déshydrase de la fraction sédimentable à environ $3.000 \times G$ sont plus élevés que ceux de la fraction sédimentable à $18.000 \times G$ (microsomes de Claude, 1946). La levure ressemble donc à ce point de vue aux cellules du foie (Hogeboom, Claude et Hotchkiss, 1946).

DISCUSSION

1° L'hypothèse formulée dans le mémoire IV de cette série, quant à la cause de la déficience respiratoire des mutants « petite colonie », se trouve pleinement confirmée par la présente étude. En effet, si l'on considère le schéma actuel du système Warburg-Keilin tel qu'il est proposé par Slater (1948) pour le muscle cardiaque :



on voit qu'il est rompu chez la souche mutante à plusieurs endroits. Spectroscopiquement, les « petites » ne possèdent pas le constituant *a* (qui est accompagné invariablement par le constituant *a*₃ = cytochrome-oxydase), ni le constituant *b* qui est lié à la succino-déshydrogénase. Qu'il ne s'agit pas dans ce cas d'une fusion de deux bandes (*a c* et *a b*), comme chez certaines levures basses de brasserie (Fink, 1932), est suggéré par le comportement de la bande située à 550 mμ. chez la levure placée à la température de l'air liquide : la bande reste unique et symétrique.

Ces constatations sont confirmées par les tests d'activité qui montrent que les levures mutantes ne peuvent pas oxyder ni leur propre cytochrome *c*, ni le cytochrome *c* pur ajouté au broyat. De même elles ne peuvent pas réduire, en présence de succinate, le cytochrome *c* ajouté. On est donc en droit de conclure qu'elles manquent la cytochrome-oxydase et la succino-déshydrogénase. Ces deux déficiences sont suffisantes pour rendre compte de l'inactivité du cytochrome *c* des « petites ». Mais nous tenons à faire remarquer que les expériences décrites ne comportent pas de démonstration directe de l'activité normale de leur cytochrome *c* dans le système reconstitué *in vitro*.

La très faible bande à 579 mμ. qui apparaît chez les « petites » congelées correspond probablement à la bande *a* du cytochrome *a*₁ qui a été observée en particulier chez les microorganismes anaérobies, tels que les levures basses de brasserie (Fink, 1932 ; Keilin, 1936) et les bactéries (Fujita, Tamyia et Yamaguchi). Cette bande représente, d'après Keilin (1933-1934), un dérivé catalytiquement inactif d'haémochromogène qui ne peut pas correspondre à la cytochrome-oxydase. Nos expériences confirment pleinement cette manière de voir.

2° Alors que le cytochrome *c* est apparemment inactif chez les « petites », la quantité en est augmentée dans ces cellules. Ceci est en désaccord avec la notion selon laquelle il existe un parallélisme entre la teneur en cytochrome *c* et l'activité respiratoire (Keilin, 1936). Les chiffres ci-dessous montrent que ce n'est pas le cytochrome *c* qui est le facteur limitant de la respiration de la levure :

	QO ₂ GLUCOSE 28°	CYTOCHROME <i>c</i> (p. 100 de poids sec)
Levure de boulangerie « petite », race BII .	2-4	0,21
Levure de boulangerie « petite », race « Yeast-Foam »	2-4	0,41
Levure de brasserie basse	12	0,07
Levure de boulangerie normale, race BII .	50-70	0,13
Levure de boulangerie normale, race « Yeast Foam »	~ 100	0,24
Levure de boulangerie (Keilin et Hartree, 1940)	~ 200 (38° C)	0,26

3° Les mesures de l'activité de la lactico-déshydrogénase ont montré que, chez les mutants, le système réduisant le cytochrome *c* n'est pas entièrement aboli. Lorsqu'on ajoute au système du bleu de méthylène, on s'aperçoit que les « petites » présentent une activité de lactico-déshydrogénase augmentée par comparaison avec les « grandes ». Il semble donc probable que les « petites » possèdent le cytochrome *b*₂. Les différences que nous avons observées entre souches de levures d'origines génétiques diverses au point de vue de leur teneur en constituants du cytochrome sont probablement à la base de l'impossibilité, souvent signalée, d'utiliser certaines levures comme sources de préparations enzymatiques (voir, par exemple, Bach, Dixon et Zerfas, 1946).

4° L'étude génétique des mutants « petite colonie » (Ephrussi, Hottinguer, Tavlitzi, 1949), ainsi que l'analyse quantitative de la transformation des populations de levure en présence d'acridine (Ephrussi, L'Ilérítier et Hottinguer, 1949) ont conduit à l'hypothèse de l'existence, dans le cytoplasme des levures normales, d'un facteur corpusculaire, autoreproductible, et dont la perte ou la mutation caractérise les cellules mutantes. Nous voudrions essayer maintenant de voir comment les faits relatés ci-dessus cadrent avec cette interprétation.

Au point de vue biochimique la mutation « petite colonie » consiste, comme nous avons vu, dans une déviation de la synthèse normale du système enzymatique assurant la respiration cellulaire. Les « petites » n'effectuent pas la synthèse de deux constituants du système et produisent des quantités augmentées de deux autres. On peut penser que ces quatre constituants se forment à partir d'un précurseur commun, dont la « différenciation » serait orientée par un facteur idiotypique.

a) Keilin (1929) a observé que la réaction du « Nadi » a lieu à l'intérieur des cellules de levure. Nous avons également constaté que le bleu d'indophénol qui se forme dans les cellules normales est concentré dans des granules cytoplasmiques. Ces granules, dont le nombre est variable d'une cellule à l'autre, mesurent de 0,3 à 1 μ . L'observation microscopique directe permet de suivre la décoloration et la recoloration d'un même granule lorsqu'on fait varier le degré d'aérobiose. A côté de ces granules colorés on observe, dans les « grandes », de nombreux granules incolores, que rien, en dehors de la couleur, ne permet de distinguer des premières. D'autre part, on trouve dans une population de « grandes » quelques cellules ne contenant pas de granules colorables.

L'examen, dans les mêmes conditions, d'une suspension de « petites » ne révèle jamais que des granules incolores.

Il est tentant de penser que les granules prenant le bleu d'indophénol représentent le facteur corpusculaire postulé par Ephrussi

et collaborateurs. Cependant, bien d'autres possibilités existent qui interdisent une telle conclusion. Il est en particulier concevable que la coloration des granules correspond à la simple accumulation du bleu d'indophénol formé ailleurs.

b) De nombreuses recherches effectuées sur des objets divers ont montré que la cytochrome-oxydase et la succino-déhydrase sont liées aux granules sédimentables par centrifugation. (Warburg, 1913 ; Szent-Györgyi, 1937 ; Ogston et Green, 1935 ; Keilin et Hartree, 1938-1940 ; Chantrenne, 1943, etc.). La conception de Stern (1939) fondée sur les données fournies par l'ultra-centrifugation et l'électrophorèse est particulièrement intéressante : les deux ferments seraient situés côte à côte sur les mêmes granules, assurant ainsi le meilleur rendement des processus respiratoires. Récemment, Claude et collaborateurs (1946) ont montré sur les cellules du foie que les gros granules ($0,5 \mu$ à 2μ) qui correspondent aux mitochondries renferment les $3/4$ de l'activité des deux enzymes en question.

Nos expériences mettent en évidence des faits analogues. Les gros granules de la levure normale renferment la plus grande partie de l'activité succino et cytochrome-oxydasique. Chez la levure mutante, la fraction apparemment identique (15 p. 100 du poids de l'extrait) ne possède aucune activité.

Deux interprétations de ces faits se présentent à l'esprit. Ou bien les « petites » ont subi la mutation, ou la perte des granules, supports des enzymes respiratoires ; ou bien la synthèse de ces enzymes est abolie, la structure des granules restant inchangée.

L'ensemble des observations qui viennent d'être relatées, pris conjointement avec les déductions de l'étude génétique, pose le problème de l'identité des granules portant le cytochrome-oxydase et la succino-déhydrase avec le facteur autoreproductible postulé par Ephrussi et ses collaborateurs.

5° Enfin, pour conclure, nous voudrions faire une remarque méthodologique.

Dans les pages précédentes, nous avons décrit des différences entre les systèmes de cytochromes de deux formes de levure, différant par leurs idiotypes. D'un autre côté, Keilin et Hartree (1940) et Slater (1948 b) ont mis en évidence des différences quantitatives dans la constitution des systèmes respiratoires des divers tissus d'un même organisme, de constitution génétique apparemment identique. Ces deux ordres d'observations nous paraissent indiquer deux voies convergeantes vers la connaissance des facteurs régissant la synthèse cellulaire des ferments respiratoires.

RÉSUMÉ

L'étude comparée des systèmes respiratoires des levures normales et des mutants « petite colonie » montre que :

- 1° Les souches mutantes sont dépourvues des cytochromes *a* et *b*, mais contiennent le cytochrome *a*₁ ;
- 2° Leur teneur en cytochrome *c* est plus élevée que celle des souches normales ;
- 3° Elles ne présentent pas d'activité de cytochrome-oxydase ou de succino-déshydrogène ;
- 4° Leur activité de lactico-déshydrogène est augmentée par comparaison avec celle des levures normales ;
- 5° L'activité de succino-oxydase est liée aux gros granules séparables par centrifugation.

BIBLIOGRAPHIE

- BACH (S. J.), DIXON (M.), ZERFAS (L. G.). *Biochem. J.*, 1946, **40**, 229.
 BALL (E. G.). *Symp. on Resp. Enzymes Madison*, 1942.
 BALL (E. G.), ANFINSEN (C. B.) et COOPER (O.). *J. biol. Chem.*, 1947, **168**, 257.
 CHANTRENNE (H.). *Enzymologia*, 1943, **11**, 213.
 CLAUDE (A.). *J. Exp. Med.*, 1946, **84**, 51.
 ELLIOT (K. A. C.) et KEILIN (D.). *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 1934, **114**, 210.
 EPHRUSSI (B.), HOTTINGUER (H.) et CHIMENES (A. M.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 351.
 EPHRUSSI (B.), HOTTINGUER (H.) et TAVLITZKI (J.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 419.
 EPHRUSSI (B.), L'HÉRITIER (Ph.) et HOTTINGUER (H.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 64.
 FINK (H.). *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1932, **210**, 197.
 FUJITA (A.), HATA (T.), NUMATA (I.) et AJISAKA (M.). *Biochem. Z.*, 1939, **301**, 376.
 FUJITA (A.), YAMAGUTCHI (S.) et TAMIYA (H.). Cité d'après SHIBATA, 1935.
 GREEN (D. E.) et BROSTEAUX (J.). *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1489.
 HOGEBOOM (G. H.), CLAUDE (A.) et HOTCHKISS (R. D.). *J. biol. Chem.*, 1946, **165**, 615.
 KEILIN (D.). *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 1925, **98**, 312.
 KEILIN (D.). *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 1929, **104**, 206.
 KEILIN (D.). *Erg. Enzymforschg.*, 1933, **2**, 254.
 KEILIN (D.). *Nature*, 1933, **132**, 783.
 KEILIN (D.). *Nature*, 1934, **133**, 290.
 KEILIN (D.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 116.
 KEILIN (D.) et HARPLEY (C. H.). *Biochem. J.*, 1941, **35**, 688.
 KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 1938, **125**, 171.
 KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 1939, **127**, 167.
 KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 1940, **129**, 277.
 KREBS (H. A.) et EGGLESTON (L. V.). *Biochem. J.*, 1940, **34**, 442.
 OGSTON (F. J.) et GREEN (D. E.). *Biochem. J.*, 1935, **29**, 2005.
 PAPPENHEIMER (A. M.) et HENDIE (E. D.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **171**, 701.
 QUASTEL (J. H.) et WHEATLEY (A. H. M.). *Biochem. J.*, 1938, **32**, 936.
 SCHNEIDER (W. C.) et POTTER (V. R.). *J. Biol. Chem.*, 1943, **149**, 217.
 SHIBATA (K.). *Erg. Enzymforschg.*, 1935, **4**, 348.

- SLATER (E. C.). *Nature*, 1948 a, **161**, 405-406.
SLATER (E. C.). *Biochem. J.*, 1948 b, **43**, 51.
SLONIMSKI (P. P.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 510.
STERN (K. G.). *Cold Spring Harbor Symposia*, 1939, **7**, 312.
STIER (T. J.) et CASTOR (I.). *J. gen. Physiol.*, 1941, **25**, 229.
STOTZ (E.). *Symp. on Resp. Enzymes Madison*, 1942.
SZENT-GYÖRGYI (A.). *Studies on biological oxidations Leipzig*, 1937.
UMBREIT (W. W.), BURRIS (R. H.) et STAUFFER (J. F.). *Manometric techniques, etc.* Burgess Publ. Co Minneapolis, 1945.
WARBURG (O.). *Arch. ges. Physiol. (PFLÜGERS)*, 1913, **154**, 599.

ACTION DE L'ACRIFLAVINE SUR LES LEVURES

VI. — ANALYSE QUANTITATIVE DE LA TRANSFORMATION DES POPULATIONS

par BORIS EPHRUSSI, PH. L'HÉRITIER et HÉLÈNE HOTTINGUER.

(Institut de Génétique du C.N.R.S.
et Institut de Biologie physico-chimique, Paris.)

Le présent travail a pour objet l'étude quantitative du mécanisme de la transformation des populations de levures en présence d'acriflavine (Ephrussi, Hottinguer et Chimènes, 1949). Rappelons que cette transformation ne se produit qu'à l'occasion de la multiplication cellulaire et porte rapidement sur l'ensemble de la population si le milieu de culture contient une concentration suffisante d'acriflavine. Elle consiste essentiellement en un remplacement des levures normales par une forme mutante stable, caractérisée par une croissance plus lente et par une taille limite réduite des colonies, à laquelle elle doit le nom de « petite colonie ».

Le problème du mécanisme de cette transformation a été posé dans le premier mémoire de cette série (*loc. cit.*). Est-elle due à l'induction spécifique de mutations ou à la sélection, en présence d'acriflavine, de mutants spontanés? L'existence, dans les cultures normales de levures, de mutants identiques à ceux qui prédominent dans les cultures acriflavinées, rendait *a priori* probable l'hypothèse d'après laquelle l'acriflavine jouerait le rôle d'un agent de sélection favorable aux mutants spontanés. Mais la rapidité du phénomène semblait exiger un taux de mutation spontanée singulièrement élevé. Somme toute, seule une étude quantitative pouvait fournir une solution du problème. Ce sont les résultats de cette étude qui sont exposés ci-dessous.

SOUCHES ET MILIEUX UTILISÉS.

SOUCHES. — Les premières expériences relatives au mécanisme de la transformation ont été réalisées sur les souches haploïdes 59 R et 59 RA (*Saccharomyces cerevisiae*) sur lesquelles le phénomène a été découvert. La description de ces souches a été donnée dans le mémoire I. Il nous suffira de rappeler ici que,

pendant la phase de croissance exponentielle, les cultures de ces souches sont constituées surtout par des groupes de 2, 3 et 4 cellules. Ces expériences furent reproduites plus tard sur la souche diploïde « Boulangerie II » (B-II) dont dérivent les précédentes et sur une souche de « petites » diploïdes B-IIA qui a été isolée de B-II. Cette levure diploïde ne forme, dans les conditions de nos expériences, que des groupes de deux cellules.

Enfin, quelques expériences ont été effectuées sur des lignées haploïdes dont la description sera donnée plus bas. Ce sont :

160/1 : dérivée d'une ascospore de « Boulangerie II » ;

160 A₆/1 : « petite acriflavinée », dérivée de 160/1 ;

276/3 b, 140-3 d, 141-a : isolées à partir d'asques de la levure américaine « Yeast Foam » (Cf. mémoire II) ;

141 aA : « petite » apparue dans une culture de 141-a en milieu acriflaviné.

MILIEUX DE CULTURE. — Toutes les expériences relatées dans ce travail ont été réalisées sur des cultures proliférant à 25° et dans le milieu à l'eau de touraillons additionné ou non d'acriflavine à 1 p. 100.000 (*loc. cit.*).

MÉTHODES.

L'étude dont nous présentons ici les résultats a consisté essentiellement à suivre, au cours des différentes phases de l'évolution d'une culture, l'accroissement de *l'effectif total de la population* et à y établir *la proportion des deux formes cellulaires*, normale et mutante. La détermination de la première de ces grandeurs ne présente pas de difficultés spéciales. Celle de la deuxième est au contraire très délicate : elle implique en effet l'identification de phénotypes qui sont des caractéristiques coloniales et impose, par conséquent, l'usage d'étalements sur milieu gélosé d'échantillons de cultures. Or, cette technique appelle trois remarques importantes :

A. — Elle ne fournirait une estimation rigoureusement correcte des effectifs cellulaires que si chaque colonie avait pour point de départ une seule cellule. Mais, comme il a été déjà noté (mémoire I), cette condition n'est pas remplie par les levûres. Aussi parlerons-nous d'accroissement du nombre de groupes cellulaires ou « unités » et non de cellules.

B. — A partir du phénotype normal ou mutant (« petite colonie ») des colonies formées sur agar nous allons donc déduire la nature de l'unité qui lui a donné naissance. Ce que nous savons des vitesses relatives de multiplication des deux formes (voir plus loin, p. 70), nous semble justifier l'hypothèse que lorsque, après étalement, on observe un mélange de « petites » et de « grandes » colonies, les premières dérivent d'unités ne contenant que des

cellules mutantes (« petites ») et les dernières d'unités contenant au moins une cellule normale (« grande »).

C. — La formation d'unités pluricellulaires par les levures bourgeonnantes introduit, sous une autre forme encore, une difficulté d'interprétation. On est amené en effet, dans certaines circonstances, à se demander quelle est, dans une culture, la fraction viable de la population. Cette dernière ne peut être déterminée que par la comparaison des résultats fournis par la numération directe des cellules et par le comptage des colonies après étalement sur agar. Or, comme nous venons de le rappeler, les colonies des levures ont pour origine des « unités » et non des cellules individuelles : la numération des colonies ne nous renseigne donc que sur le nombre d'unités contenant au moins une cellule viable. Cependant, les groupes subissent au cours du temps une sorte de « ségrégation » ; une mortalité appréciable, causée par un facteur expérimental, devrait donc, avec le temps, conduire à l'apparition et l'augmentation de la proportion des groupes ne fournissant pas de colonies sur milieu gélosé. Disons dès maintenant que les comptages à l'hématimètre des groupes cellulaires donnent, d'un bout à l'autre des expériences dont il sera question, des résultats (voir p. 69) qui concordent d'une façon satisfaisante avec les résultats fournis par les numérations des colonies ; la mortalité des cellules ne peut donc intervenir que d'une façon négligeable dans ces expériences.

ÉVOLUTION DES SOUCHES 59 R ET B II EN PRÉSENCE D'ACRIFLAVINE.

Dans une première série d'expériences nous avons suivi l'accroissement en milieu acriflaviné (a) des effectifs des deux types cellulaires dans une culture d'une souche haploïde normale ; (b) de l'effectif total d'une culture pure de « petites » de la même souche.

A cet effet, deux ballons de 1 litre, contenant chacun 300 cm³ de milieu acriflaviné, sont ensemencés l'un avec 5.000.000 d'unités de la souche 59 R (« grande »), l'autre avec un nombre sensiblement égal d'unités de la souche 59 RA (« petite acriflavinée »). Ces dernières, avant leur utilisation, avaient subi un nombre variable de passages en milieu liquide (de 11 à 215, selon les expériences). Les ballons sont placés à 25° et sont agités toutes les deux heures. Des échantillons y sont prélevés à des intervalles de quelques heures, convenablement dilués, puis étalés sur milieu gélosé dans des boîtes de Petri qui sont, à leur tour, placées à 25°. La numération des colonies est faite au bout de trois à quatre jours : à ce moment les deux types de colonies peuvent être différenciés sans ambiguïté.

Plusieurs expériences de ce type ont été réalisées et ont fourni

des résultats remarquablement uniformes. Ceux de l'une de ces expériences sont donnés par le tableau I et représentés graphiquement dans la figure 1. Y sont portés en ordonnée les logarithmes de base 2 des nombres de colonies et, en abscisse, le temps. Ces coordonnées ont été choisies pour faciliter le calcul, à partir des pentes des courbes, des longueurs des générations cellulaires.

TABLEAU I. — Expérience C 3. Croissance des souches 59R et 59R-A dans le milieu acriflaviné à 1 p. 1.000 000.

HEURES	59R			59RA
	N	n	α	n
0	1.768	7	3,7	1.539
4	1 993	157	83	2.097
6	2.110	836	411	3.060
8	2.046	2.980	724	4 419
10	1.616	6.200	601	6.788
12	1.064	12.344	0	9 220
16	210	34.360	0	22 530
20	30	100.350	0	55.360
24	0	279.000	0	172.080
28	0	679.040	0	531.520

N, nombre de « grandes » par 0,1 cm³; n, « nombre de petites » par 0,1 cm³.

L'examen de la figure 1 permet de constater que le nombre de « grandes » unités dans la culture de la souche 59 R augmente à peine au cours des premières heures, puis, huit à dix heures après le début de l'expérience, commence à décroître rapidement, pour tomber pratiquement à 0 vers vingt-quatre heures. [Notons que, parmi ces « grandes », beaucoup présentent, dès la quatrième heure, des contours irréguliers qui nous les ont fait appeler « colonies festonnées » (voir mémoire I). A partir de dix heures toutes les grandes colonies appartiennent à ce type]. L'évolution de l'effectif des « petites » de la même souche est tout autre. Il s'accroît avec une très grande rapidité dès le début de l'expérience (pente = 0,7 à 1,2), puis, vers huit à dix heures, son accroissement se ralentit et se fait désormais selon une droite de pente plus faible. Cette dernière est sensiblement égale à celle de la pente unique de la courbe d'accroissement des unités de la souche pure de « petites » 59 RA (pente = 0,38).

L'effet de l'acriflavine est donc pratiquement immédiat. Dans une culture de levures normales, l'accroissement du nombre des « petites » excède de loin, dès le début de l'expérience, leur rythme de multiplication normal, tandis que les « grandes » cessent de se multiplier (comme telles, tout au moins) dès qu'elles

sont placées dans le milieu acriflaviné. Le rythme accéléré de l'accroissement des « petites » se maintient jusqu'à ce qu'elles représentent 9/10 de l'effectif total de la population.

La description qui vient d'être donnée convient presque sans

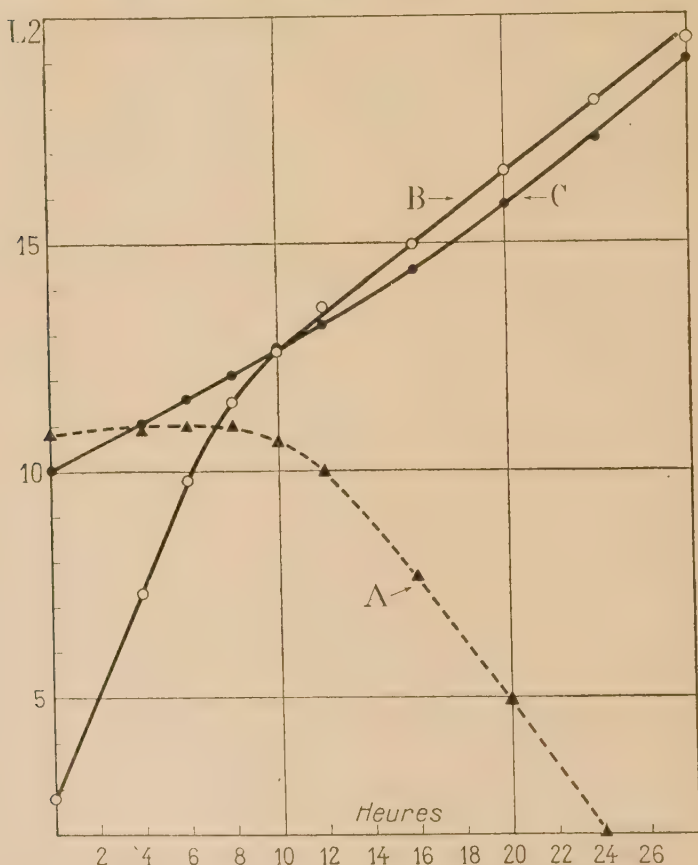


FIG. 1. — Courbes de croissance des souches 59R et 59RA en milieu acriflaviné (expérience C-3). A, effectif des « grandes » dans la culture de la souche 59R; B, effectif des « petites » dans la même culture; C, effectif de la culture de la souche 59RA. Ordonnée : Log. 2 du nombre de colonies; abscisse : heures.

retouches à ce que l'on observe si l'on traite de la façon décrite une levure diploïde. La courbe représentant l'accroissement de l'effectif des « petites » dans le ballon ensemencé avec la souche normale présente les deux mêmes segments caractéristiques : le premier pendant les six premières heures et le deuxième au delà de huit heures. Seules les pentes sont ici plus raides.

Avant de passer à l'interprétation de ces faits, nous allons compléter les résultats qui viennent d'être résumés par ceux d'une expérience destinée à confronter les résultats des estimations des effectifs totaux des cultures par numération des colonies sur agar avec ceux obtenus par comptage direct à l'hématimètre des cellules ou des groupes cellulaires.

Cette expérience, effectuée sur la souche 59 R, a été conduite de façon semblable à celle décrite plus haut. Seule l'importance de l'inoculum était modifiée : afin d'avoir, dès le départ, des nombres de cellules plus élevés par unité de volume, celui-ci contenait 50.000.000 d'unités. Les comptages à l'hématimètre et des étalements sur agar étaient effectués simultanément à des intervalles de quelques heures. Nous donnons ci-dessous les chiffres obtenus par les deux procédés, ainsi que leur rapport (tableau II).

TABLEAU II. — Comparaison des données fournies par le comptage des colonies et les numérations à l'hématimètre (Expérience C-5).

HEURES	<i>a</i> NOMBRE d'unités en milliers par 0,1 cm ³ (Hématimètre)	<i>b</i> NOMBRE de colonies par 0,1 cm ³	RAPPORT <i>a/b</i>	NOMBRE moyen de cellules par unités
0	14,6	17	0,86	1,6
4	19,6	17,9	1,1	2,3
7	26,5	24,9	1,07	3,2
10	37,5	43,0	0,87	2,9
14	96,9	80,5	1,2	2,4
17	208,2	183,3	1,14	2,6
26	1.700,0	1.451,0	1,17	1,8

On voit que la valeur de ce dernier ne montre aucune variation systématique au cours du cycle de croissance et qu'au total l'accord est satisfaisant entre les deux sortes de données (1). La mortalité cellulaire ne peut donc intervenir dans nos expériences que d'une façon négligeable et ceci réduit le nombre d'hypothèses que l'on peut formuler pour interpréter les faits observés.

★
★ ★

Les faits saillants de l'évolution d'une population de levure normale dans le milieu acriflaviné sont donc : *a*) l'arrêt immédiat de l'accroissement du nombre des « grandes » ; *b*) l'accroissement

(1) Les chiffres ci-dessus permettent de constater également que le nombre moyen de cellules par « unité » varie très peu pendant la durée de l'expérience.

des « petites » selon un rythme accéléré au cours de la phase initiale de la culture ; c) le rétablissement, pendant la seconde phase de leur croissance, c'est-à-dire à partir du moment où elles représentent la fraction la plus importante de la population totale, de leur taux de multiplication normal. Ce dont il s'agit de rendre compte est l'accélération initiale de l'accroissement des « petites ».

Puisque le taux de multiplication des « petites », pendant la seconde phase, est pratiquement égal à celui des « petites » en culture pure, nous pouvons admettre que, pendant cette phase, l'accroissement de leur effectif est dû à leur multiplication propre. Le taux plus élevé que l'on observe pendant la phase initiale de la culture peut alors relever de l'un des deux mécanismes suivants :

I. *Stimulation de la multiplication des « petites » par un produit émanant des « grandes »* ; pour rendre compte du caractère transitoire de cette stimulation, il suffirait d'admettre que ce produit est instable ou n'est formé qu'en quantité limitée.

II. *Superposition, pendant la première phase de croissance, de deux processus* : a) *multiplication selon un rythme normal des « petites » déjà formées* et b) *néoformation de « petites » à partir des « grandes »*.

La première de ces hypothèses est essentiellement une hypothèse de sélection, car elle ne fait appel qu'à l'accélération de la multiplication des « petites » normalement présentes dans toute culture de levure de boulangerie. Dans la seconde, l'accélération porte au contraire sur le processus même de mutation « grande » → « petite ». Ceci revient à dire qu'elle suppose une induction de mutations.

TEST DE L'HYPOTHÈSE DE STIMULATION.

L'hypothèse de stimulation a été mise à l'épreuve en inoculant un ballon de milieu acriflaviné avec un mélange de deux cultures de levure, dont l'une est une levure normale (« grande ») et l'autre une souche pure de « petites acriflavinées » d'un type différent, et en suivant l'accroissement des effectifs des deux sortes de « petites ». Si les « grandes » libéraient un produit stimulant, l'action de ce produit devrait se faire sentir aussi bien dans la croissance des « petites » dérivées de la souche normale que dans celle des « petites » surajoutées.

L'expérience a été réalisée une première fois avec les souches 276/3 b et 160 A₆/1. La première de ces souches forme sur agar de grandes colonies plissées, de contour irrégulier. Les « petites » (spontanées ou acriflavinées) auxquelles elle donne naissance ont des colonies rondes et très aplaties, dont la surface se couvre, au bout de trois à quatre jours, de craquelures. Les

colonies de la souche 160 $A_6/1$, « petite acriflavinée », sont par contre coniques et parfaitement lisses. Ces deux sortes de « petites » peuvent donc être distinguées sans difficulté.

5.000.000 d'unités de la souche 276/3 *b* et 230.000 unités de la

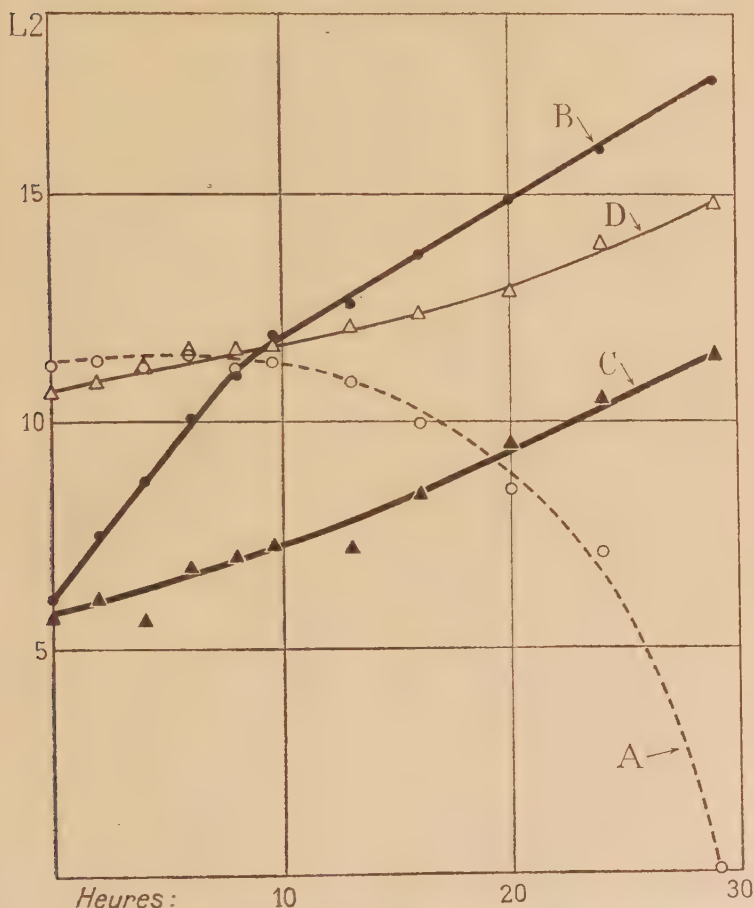


FIG. 2. — Croissance dans un même ballon de milieu acriflaviné des souches 276/3 *b* et 160 $A_6/1$. A, effectif des « grandes » de la souche 276/3 *b*; B, effectif des « petites » de la même souche; C, effectif des petites 160 $A_6/1$; D, croissance des « petites » 160 $A_6/1$ en culture pure (témoin). Ordonnée : Log. 2 du nombre de colonies; abscisse : heures.

souche 160 $A_6/1$ sont ensemencées dans un ballon de milieu acriflaviné. Deux autres ballons contiennent les cultures-témoins : l'un est ensemencé avec 5.000.000 d'unités de la souche 160 $A_6/1$, l'autre avec le même nombre d'unités de la souche 160/1

(« grande »). La marche de l'expérience est ensuite identique à celle des expériences décrites plus haut.

Les résultats sont donnés par la figure 2. On voit que, dans le

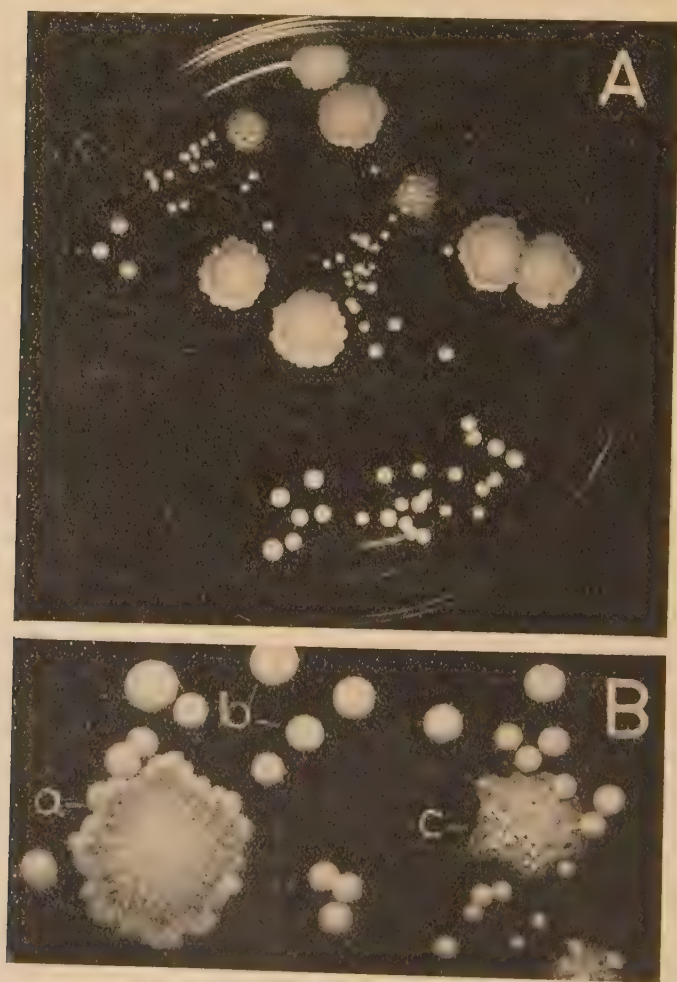


FIG. 3. — Photographie d'une boîte de Petri contenant un mélange de trois types coloniaux. B, détail de la même photographie : *a*, 140-3 *d* « grande » ; *b*, 140-3 *d*, « petite » issue de la transformation de la précédente ; *c*-141 *aA*, « petite » ajoutée à la culture de la souche 140-3 *d*.

ballon ensemencé avec le mélange des deux souches, le nombre des « grandes », encore une fois, reste pratiquement constant pendant une dizaine d'heures, puis décroît rapidement (courbe A).

L'accroissement des « petites » du même type (courbe B) suit de nouveau la courbe caractéristique avec une phase d'accélération initiale. Mais l'accroissement des « petites » 160 A₆/1, qui prolifèrent dans le même ballon (courbe C), est beaucoup plus lent, et son taux reste, d'un bout à l'autre de l'expérience, très voisin de celui qui caractérise la croissance de cette souche lorsqu'elle évolue toute seule dans un ballon séparé (courbe D). Si la légère différence entre les pentes des deux dernières courbes traduit une certaine stimulation, celle-ci est de beaucoup inférieure à ce qui serait requis pour rendre compte de l'accélération initiale de la multiplication des « petites » de la souche 276/3 b. Par ailleurs, elle n'est pas limitée aux premières heures de la culture.

Ajoutons enfin que les chiffres fournis par les numérations des « petites » du troisième ballon, montrent clairement que lorsque la souche 160/1 donne naissance, sous l'action de l'acriflavine, aux « petites » 160A, la formation de celles-ci comporte bien la phase initiale caractéristique de multiplication rapide.

Avant de tirer de cette expérience la conclusion qui semble s'imposer, nous allons mentionner brièvement les résultats d'une expérience analogue, destinée à répondre à l'objection suivante. Dans l'expérience qui vient d'être décrite, les deux « petites » dont on compare la croissance appartiennent à des races de levure différentes. On pourrait imaginer que l'absence de stimulation des « petites » 160 A₆/1 en présence des « grandes » 276/3 b est due à la spécificité du produit que ces dernières mettent en liberté. Quoique cette hypothèse soit *a priori* invraisemblable du fait que l'expérience est faite dans un milieu complet, nous avons reproduit cette expérience avec deux autres souches, toutes les deux dérivées de la levure « Yeast Foam » : les souches 140-3 d et 141 aA. La photographie de la figure 3 remplacera avantageusement la description des trois types coloniaux formés à la suite de la prolifération du mélange dans le milieu acriflaviné et il nous suffira de dire que les résultats de cette expérience ont entièrement confirmé ceux de la précédente, en montrant que les « petites » surajoutées ne subissent pas de stimulation appréciable du fait de leur développement en présence des « grandes ».

L'hypothèse de stimulation n'est donc pas confirmée par l'expérience.

CALCUL DES TAUX DE TRANSFORMATION.

Ce qui vient d'être dit nous ramène à l'hypothèse II. Dans ce qui suit nous allons donc admettre que la rapidité de l'accroissement du nombre des « petites » en présence d'acriflavine est due à une transformation des « grandes » en « petites » et nous allons essayer d'évaluer la contribution de ce mécanisme à l'accroissement de leur effectif.

Si p est le nombre de « petites » à un instant donné et k leur taux de multiplication normal, la vitesse d'accroissement dp/dt est donnée par l'expression :

$$\frac{dp}{dt} = kp + \alpha,$$

où α représente la contribution apportée à l'accroissement du nombre de « petites » par la transformation « grande » \rightarrow « petite ».

Si on appelle y le log. de base 2 de p (c'est-à-dire l'ordonnée que nous avons utilisée dans la construction des courbes de croissance) on a

$$dy = \frac{1}{L2} \cdot \frac{dp}{p}$$

d'où

$$\alpha = p(L2 \frac{dy}{dt} - k).$$

$L2$ désigne le logarithme népérien de 2. La valeur de K s'obtient aisément à partir de la pente d'accroissement des « petites » dans la deuxième phase de l'expérience, où seul intervient leur taux de multiplication propre ; elle est égale à cette pente multipliée par $L2$. En définitive, pour obtenir à chaque instant la valeur de α , il suffit donc de multiplier $pL2$ par la différence entre la pente de la courbe représentant à cet instant l'évolution du nombre de « petites » et la pente limite.

Le taux de transformation $\frac{\alpha}{G}$ des « grandes » en « petites » est alors obtenu en rapportant α au nombre de « grandes ».

Ce calcul, effectué sur les données de deux expériences (C-2 et C-3) avec la souche haploïde 59 R et d'une expérience (D-1) avec la souche diploïde B II, fournit les valeurs suivantes des taux de transformation α/G (2) :

HEURES	C — 2	C — 3	D — 1
0	0,0028	0,0021	0,0042
3			0,0404
4	0,023	0,041	
4,5			0,216
6	0,064	0,195	0,320
8	0,179	0,353	0,478
10	0,268	0,373	0,603
12	0?	0?	0?

On voit que dans les cultures haploïdes, le taux de transformation, qui est au départ de 0,0028 et de 0,0021, s'accroît rapide-

(2) Les valeurs de α trouvées dans l'expérience C-3 figurent dans la dernière colonne du tableau I.

ment au cours des dix premières heures, pour atteindre les valeurs élevées de 0,268 et 0,373 à la fin de cette période. Autrement dit, à la fin de la première phase de la culture, une « grande » produit en moyenne environ 0,3 « petites » par heure. Au delà de cette période la même méthode de calcul fournit pour α/G des valeurs nulles, mais cela ne signifie évidemment pas que la transformation des « grandes » en « petites » soit terminée, car il est facile de voir que les déterminations de α et surtout de α/G deviennent mauvaises dès que les « grandes » ne représentent plus qu'une très faible fraction de la population totale.

La comparaison de ces résultats avec ceux observés avec la levure diploïde révèle que chez cette dernière le taux de transformation initial est deux fois plus élevé et qu'au cours de la phase initiale de la croissance il subit un accroissement encore plus considérable que chez les haploïdes : dans l'expérience citée il atteint la valeur de 0,6. Ce fait est vraisemblablement en relation avec le fait que les unités diploïdes sont constituées par des cellules moins nombreuses que les unités haploïdes.

L'ensemble de ces résultats ne laisse pas de doute sur la réalité de l'augmentation très considérable des taux de transformation sous l'action de l'acriflavine.

TAUX DE TRANSFORMATION SPONTANÉE.

Les taux de transformation trouvés au temps 0 dans les expériences précédentes doivent correspondre à la transformation spontanée des « grandes » en « petites », en dehors de l'action de l'acriflavine. Or, ce taux de transformation spontanée (a) peut être déduit de façon indépendante de la fréquence des « petites » dans une population en équilibre et du rapport (λ) entre les durées de génération des « grandes » et des « petites ». En effet, partant d'une cellule « grande » que l'on suppose se multipliant indéfiniment dans un milieu illimité, le rapport r du nombre des « petites » au nombre des « grandes » est, au bout de n générations de « grandes », donné par l'expression :

$$r = \frac{a \cdot 2^1 - \lambda}{1 - (1 - a) 2^1 - \lambda} \left[\frac{1}{[(1 - a) 2^1 - \lambda]^n} - 1 \right]$$

Si a et λ sont tels que la relation

$$(1 - a) 2^1 - \lambda > 1$$

est vérifiée, on voit que, lorsque n croît indéfiniment, r tend vers une limite e qui est donnée par :

$$e = \frac{a \cdot 2^1 - \lambda}{(1 - a) 2^1 - \lambda - 1}$$

Puisque a est petit et λ voisin de 1, cette expression peut être mise sous la forme simplifiée :

$$e = \frac{a}{(1-\lambda)L^2},$$

d'où

$$a = e (1 - \lambda) L^2.$$

Le nombre ainsi trouvé représente, on le voit, le taux de transformation spontanée par génération de « grandes ». Pour faciliter les comparaisons, il suffira de le diviser par la durée de génération des « grandes » pour obtenir la valeur du taux de transformation spontanée par unité de temps.

Les déterminations des grandeurs requises pour ce calcul ont été faites sur les souches 59 R et B II. D'une part, des statistiques portant sur environ 8.000 colonies 59 R et 5.000 colonies B II ont fourni pour e des valeurs de 0,0066 et 0,0058, respectivement. D'autre part, une série de déterminations des durées de génération ont été faites selon la technique des expériences décrites plus haut, mais dans le milieu dépourvu d'acriflavine. Elles ont fourni les valeurs moyennes des durées de génération suivantes (en heures) : 59 R-1,9 ; 59 RA (« petite »)-2,74 ; B II-1,7 ; B II-A (« petite »)-3,4.

Le calcul fondé sur ces données fournit des valeurs de a qui sont, par heure, 0,0008 pour la souche 59 R et 0,0012 pour la souche B II. Ces valeurs sont, on le voit, inférieures à celles trouvées au temps 0 dans les expériences en milieu acriflaviné, ce qui est très probablement dû à ce que l'action de l'acriflavine est immédiate. Par ailleurs, elles confirment ce que nous avons déjà vu plus haut, à savoir que le taux de mutation spontanée est, chez les diploïdes, du même ordre de grandeur que chez les haploïdes.

DISCUSSION.

Les expériences décrites dans les pages précédentes montrent clairement que l'acriflavine provoque la transformation des « grandes » en « petites ». On doit se demander alors quel est, à l'échelle cellulaire, le mécanisme de cette transformation, ce qui revient à poser la question de la nature génétique de la forme mutante. Il convient de commencer cette discussion par la considération de la signification des « taux de transformation ».

Ce qui nous a fait introduire ce terme, et ce qui nous empêche encore de passer des taux de transformation aux taux de mutation proprement dits, est le fait que ce sont des « unités » pluricellulaires et non des cellules isolées qui sont à l'origine des colonies sur agar. Les taux de transformation représentent, somme toute, une sorte de ségrégation des « unités mixtes » en

« unités de petites pures » et de « grandes ». Mais il est évident que la proportion d'unités mixtes est, à chaque instant, fonction du taux de mutation proprement dit. Comme la ségrégation des unités mixtes requiert un certain nombre de générations cellulaires, elle doit retarder la manifestation des mutations. On peut donc penser qu'au cours des premières heures tout au moins, les taux de mutations véritables présentent des valeurs supérieures à celles des taux de transformation. Ces considérations, *a priori*, semblent être confirmées par la comparaison des taux de transformation que nous avons trouvés pour les levures haploïdes et diploïdes ; les premiers sont inférieurs aux derniers, et il nous paraît vraisemblable que cela est dû à ce que les « unités » haploïdes comportent plus de cellules que les « unités » diploïdes.

Au total, il nous paraît incontestable que, si nous avons trouvé, au cours des premières heures de l'action de l'acriflavine, un fort accroissement des taux de transformation, celui-ci ne peut signifier qu'une augmentation considérable de la fréquence des mutations.

Ces remarques faites, nous pouvons aborder le problème de la nature de la mutation « grande » → « petite ».

1° L'étude génétique des mutants « petite colonie » (mémoire II, Ephrussi, Hottinguer et Tavlitzi, 1949) a déjà conduit à la conclusion qu'ils n'étaient pas les produits de mutation génique. Elle a en effet montré que le caractère mutant ne réapparaît que tout à fait exceptionnellement dans la descendance des hybrides issus du croisement entre « grandes » et « petites » (3). Depuis l'envoi du mémoire II, on a pu montrer, dans notre laboratoire, que le croisement « petite » × « petite » (que nous n'avions pas réussi auparavant) donne une descendance composée exclusivement de « petites ». Ce fait, considéré en liaison avec le précédent, permet d'être encore plus affirmatif quant à (a) la nature idiotypique de la mutation et (b) sa nature non génique, c'est-à-dire très probablement cytoplasmique.

La présente étude apporte des éléments nouveaux qui viennent renforcer le dernier point.

Il a déjà été noté (mémoire I) que la transformation observée en acriflavine exigeait des taux de mutations élevés. Nous avons maintenant pu chiffrer les deux taux de transformation, dont le rapport avec les fréquences de mutations vient d'être discuté. Or, les valeurs que nous avons trouvées, aussi bien d'ailleurs que celles calculées pour les taux de transformation spontanée,

(3) Notons toutefois que les croisements ont été effectués avec des levures de souches différentes de celles utilisées dans le présent travail.

dépassent de loin celles qui sont caractéristiques des mutations géniques habituelles.

Rappelons aussi que les taux de transformation spontanée présentent des valeurs du même ordre chez les levures haploïdes et diploïdes. Ce fait, compte tenu des résultats de l'étude génétique, est également contraire à l'interprétation génique des mutants étudiés.

Il convient donc d'envisager pour les phénomènes qui nous préoccupent, une interprétation qui ne repose pas sur des mécanismes géniques.

2° L'interprétation qui nous paraît rendre le mieux compte de l'ensemble des observations relatives à la mutation « petite colonie » est fondée sur l'hypothèse que le phénotype normal des levures requiert, pour sa réalisation, la présence d'un facteur corpusculaire autoreproductible, logé dans le cytoplasme des « grandes » et distribué au hasard au cours de la division cellulaire.

A. — La manière la plus simple d'envisager la mutation des « grandes » en « petites » est alors d'admettre qu'elle consiste dans la perte des particules autonomes. La mutation spontanée serait due à la perte occasionnelle de ces particules, résultant de leur distribution au hasard, lors du bourgeonnement, entre la cellule mère et le bourgeon : il suffirait, en effet, que leur nombre, par cellule, ne soit pas trop élevé pour que des bourgeons dépourvus de particules se rencontrent avec une fréquence non négligeable. D'un autre côté, on peut admettre que l'effet de l'acriflavine est dû à son action toxique élective sur ces particules, dont elle causerait l'arrêt de multiplication. Les bourgeons formés en présence d'acriflavine auraient ainsi des chances accrues de n'en pas recevoir.

B. — L'interprétation qui vient d'être formulée cadre parfaitement avec une première caractéristique importante de la transformation des levures en présence d'acriflavine, à savoir sa liaison avec le processus de multiplication cellulaire. Mais nous allons présenter maintenant deux ordres de faits qui semblent suggérer que la situation réelle est moins simple que celle que nous venons d'imaginer.

a) La mutation par perte totale des particules autoreproductibles, telle qu'elle était envisagée en (A), devrait, par définition, être irréversible. Le mémoire I contient des données relatives à ce problème. On se souvient que des lignées de « petites spontanées » et « acriflavinées » ont pu être isolées, qui se sont montrées stables au cours de plusieurs centaines de repiquages dans des conditions où la forme normale possède un avantage sélectif. Ces mutants sont donc, semble-t-il, incapables de réversion. Mais il a été noté également que, parmi les petites colonies

qui viennent de se former, sous l'action de l'acriflavine par exemple, un certain nombre forment un mélange de « petites » et de « grandes » colonies, lorsque les cellules qui les constituent sont réétalées sur milieu gélosé normal. Quoiqu'un tel mécanisme ne soit pas entièrement exclu, il ne paraît pas probable que la réapparition de colonies normales soit due à l'inclusion dans une petite colonie de quelques « grandes cellules » provisoirement inhibées par l'acriflavine et qui, après retour sur milieu ordinaire et avec le temps, reviennent à l'activité normale. En effet, d'une part, le même phénomène peut être observé sur des « petites » spontanées, c'est-à-dire en dehors de toute intervention d'une substance inhibitrice. D'autre part, il semble bien que des « petites », reprises dans une culture constituée par un mélange de « grandes » et « petites » colonies, redonnent souvent à leur tour un mélange de colonies normales et mutantes ; pourtant ici les chances d'inclusion de « grandes » inhibées sont infiniment réduites. Ces faits ont été considérés comme indication de l'existence possible d'un état intermédiaire entre la forme normale et la forme mutante irréversible. Cet état intermédiaire serait relativement rare et instable.

Or, l'existence d'un terme de passage entre les deux états est incompatible avec l'hypothèse de la perte totale des particules.

a) On peut en rendre compte en supposant qu'il existe un seuil de concentration de particules au-dessous duquel la cellule se comporte comme une « petite », quoique son potentiel héréditaire ne soit pas qualitativement modifié. Dans certains cas l'action de l'acriflavine sur la cellule pourrait n'être que partielle et faire descendre la concentration des particules au-dessous du seuil sans qu'il y ait perte totale. Le jeu même de la répartition au hasard des particules, lors du bourgeonnement, rendrait alors instable cet état de la cellule, dont la multiplication donnerait naissance soit à des « petites » définitives, soit, lorsque la concentration des particules remonterait fortuitement, à des « grandes » stables.

β) Mais on peut envisager également l'existence d'un état instable de la particule elle-même. Celle-ci serait inactivée par l'acriflavine, mais cette inactivation comporterait une phase réversible à partir de laquelle la particule pourrait soit récupérer son activité normale, soit atteindre un état d'inaction définitive. Celui-ci peut évidemment être envisagé de deux manières. La particule, définitivement atteinte à la fois dans son activité et son pouvoir de reproduction, peut disparaître ou bien elle subit une véritable mutation irréversible tout en gardant son pouvoir de reproduction.

Si l'on ne considère la réversibilité des « petites » que sous la forme révélée par les expériences qui viennent d'être rappelées,

L'hypothèse (α) paraît suffisante. Comme elle présente sur l'hypothèse (β) l'avantage de la simplicité, nous nous en serions tenus à (α). Mais elle ne rend compte que malaisément d'une dernière catégorie de faits que nous allons exposer maintenant.

b) En décrivant plus haut les étapes de la transformation d'une population de levure en présence d'acriflavine, nous avons noté que, dès la quatrième heure, beaucoup de « grandes » présentent l'aspect « festonné » et que la proportion de « grandes » de ce type croît rapidement avec le temps.

Rappelons, d'autre part, que lorsque les levures sont cultivées sur du milieu gélosé contenant de l'acriflavine à la concentration de 1 p. 500.000-1.000.000, elles ne forment que des colonies festonnées (mémoire I). Lorsqu'une colonie festonnée est dissociée dans un peu de liquide et immédiatement réétalée sur gélose, il s'y développe un mélange de « petites » et de « grandes » colonies et un certain nombre des dernières se festonnent à leur tour.

Notons en outre que les irrégularités des contours des colonies festonnées ne correspondent pas à la présence de secteurs constitués les uns par des « petites », les autres par des « grandes ».

Les colonies festonnées représentent donc une population où coexistent côte à côte, et pendant des périodes prolongées, les deux types cellulaires : les « grandes » et les « petites ». Or, il est facile de montrer que, dans des conditions normales, une telle coexistence n'est pas possible. Si l'on mélange, en proportions variées, des cellules des deux types, et si l'on dépose à la surface de l'agar I goutte du mélange, on obtient ce que l'on appelle des colonies géantes. La dissociation de celles-ci montre qu'en quelques jours les « grandes » ont pris le dessus sur les « petites », de sorte que même lorsqu'on est parti d'une proportion de 50 « petites » pour 1 « grande », le pourcentage de « petites » retrouvé en fin d'expérience est sensiblement égal à la valeur d'équilibre habituelle.

Comme chaque colonie a pour point de départ un groupe cellulaire, on pourrait penser que la formation des colonies festonnées est due à la présence, dans « l'unité » dont elle est partie, de « grandes cellules » se multipliant à un rythme ralenti, à côté de quelques « petites » moins affectées par l'acriflavine. Mais le fait que toute la masse de la colonie semble formée d'un mélange des deux types cellulaires, le fait aussi que le festonnage peut apparaître et se maintenir pendant plusieurs jours sur le milieu normal, suggèrent plutôt que le phénomène est dû au maintien prolongé du taux de transformation élevé induit par l'acriflavine. En suivant l'hypothèse (α) on pourrait penser qu'une colonie festonnée doit son origine à quelques cellules suffisamment appauvries en particules cytoplasmiques pour que leur

bourgeoisement donne pendant de nombreuses générations des « grandes » et des « petites » avec des fréquences sensiblement égales.

Mais lorsqu'on suit de jour en jour le développement des colonies festonnées, on constate que certaines d'entre elles commencent par proliférer comme des « petites ». Ceci est presque toujours le cas, en particulier pour les levures diploïdes se développant sur agar acriflaviné. Pour rendre compte de la réapparition de « grandes cellules » au sein de telles colonies, il faut admettre, d'une part, que les « petites » qui constituent ces colonies contiennent un nombre de particules inférieur au seuil et que dans certaines lignées cellulaires, d'autre part, *ce nombre arrive à remonter* au-dessus de ce seuil. Quoique nous ne connaissions rien des conditions qui règnent à l'intérieur d'une culture, ce dernier mécanisme paraît peu vraisemblable et le phénomène de festonnage semble cadrer mieux avec l'hypothèse selon laquelle les colonies festonnées auraient pour origine des groupes cellulaires contenant des particules dans un état instable (hypothèse β).

3° Quel que soit, en définitive, le mécanisme intime de la transformation, il est remarquable que la mutation induite par l'acriflavine présente un caractère adaptatif et a une saveur lamarckienne indéniable. On peut constater, en effet, qu'en présence de l'acriflavine les « grandes » ne se multiplient que très lentement. Si on se reporte, par exemple, à l'expérience C-3 et que l'on intègre *adt* pendant les dix premières heures, on arrive au résultat que 2.836 « petites unités » nouvelles ont été formées, en tout, par la transformation des « grandes ». Le nombre de celles-ci étant d'environ 1.800, il a donc été multiplié par 3 environ en dix heures, $2/3$ étant devenues des « petites », $1/3$ étant restées « grandes ». Donc, la longueur moyenne de génération des « grandes » est d'environ 6,3 heures, contre 1,9 heures dans le milieu normal. La longueur moyenne de génération des « petites » est de 3,1 heures en milieu acriflaviné et de 2,74 heures en milieu normal. La multiplication des « petites » est donc moins retardée par l'acriflavine que celle des « grandes ».

4° Il nous paraît opportun de rappeler à cet endroit que les études physiologiques et biochimiques effectuées sur les levures qui nous préoccupent ici ont conduit à la conclusion que la mutation « petite colonie » est caractérisée par la perte de deux enzymes indispensables au déroulement normal des oxydations respiratoires : la cytochrome-oxydase et la succino-déshydrogène (Slonimski et Ephrussi, 1949). La disparition simultanée de ces deux ferments est moins surprenante que cela peut paraître de prime abord. D'une part, en effet, ils sont tous les deux liés, dans la cellule vivante, aux gros granules séparables par centri-

fugation (voir bibliographie dans le mémoire V). D'autre part, selon Stern (1939), les préparations purifiées (homogènes d'après les tests de l'ultracentrifugation et de l'électrophorèse) présentent les deux activités enzymatiques. Celles-ci apparaissent ainsi comme intimement liées, sinon inséparables l'une de l'autre.

L'image la plus simple que l'on puisse se faire, sur le plan biochimique, d'une telle mutation se superpose donc parfaitement à celle à laquelle conduit l'analyse purement formelle de l'induction de cette mutation et de son comportement dans les croisements : elle consisterait dans la perte des granules qui servent de support à ces ferments (ou les contiennent) et qui sont peut-être nécessaires à leur synthèse. Notons toutefois sans tarder qu'elle confère aux granules sédimentables la propriété d'autoreproduction qui reste à prouver.

Il a été montré précédemment que les levures normales donnent une réaction positive du Nadi (réaction colorée, spécifique de l'indophénol-oxydase) et que cette réaction est négative chez les « petites » (Slonimski et Ephrussi, 1949). Le bleu d'indophénol apparaît, dans les « grandes », au niveau de gros granules dont le nombre est variable de cellule à cellule. Quoique rien ne prouve que ces granules sont effectivement le siège de la réaction, c'est-à-dire de l'indophénol-oxydase, on peut se demander s'ils ne correspondent pas aux granules autoreproductibles dont nous avons été conduits à postuler l'existence.

Cependant, aussi tentantes que soient ces spéculations, il ne faut pas perdre de vue que sur le plan biochimique on retrouve le même dilemme que nous avons rencontré plus haut : perte ou mutation ? Alors que l'hypothèse de la perte totale des granules séduit par sa simplicité, celle de leur mutation n'est pas moins vraisemblable. Enfin, il reste entièrement possible que la mutation porte sur un facteur autoreproductible essentiel pour la synthèse des deux ferments qui n'a rien à voir avec les éléments jusqu'ici identifiés.

5° La variation et la transmission de nombreux enzymes ont été étudiées chez les Animaux et chez les Plantes (voir revue de Beadle, 1945). C'est le cas notamment chez les Levures, des enzymes intervenant dans la synthèse des vitamines et des acides aminés et dans les premières étapes de la dégradation des glucides (voir revue de Lindegren, 1945, 1949 ; Winge et Roberts, 1948). Malgré quelques affirmations contraires (Spiegelman, Lindegren et Lindegren, 1945 ; Lindegren et Lindegren, 1946 ; Spiegelman, 1946), il semble bien établi que dans tous les cas jusqu'ici étudiés la présence et la transmission de ces ferments soient sous la dépendance de gènes mendéliens.

Les recherches relatives dans cette série de mémoires envisagent, à notre connaissance pour la première fois, à ce point de vue, les enzymes respiratoires. La conclusion à laquelle nous

avons abouti, à savoir l'existence d'un facteur héréditaire cytoplasmique essentiel à leur synthèse et transmission, fait donc apparemment exception aux règles précédemment établies. Il nous paraît important de faire remarquer que nos conclusions n'excluent cependant point la possibilité d'un contrôle génique dont nos expériences n'ont pas permis la mise en évidence (cf. les études de Sonneborn sur les *Paramaecies*).

Il n'en reste pas moins que des facteurs autres que ceux généralement reconnus sont aptes à causer la variation héréditaire de certains constituants cellulaires. Ce fait mérite, à notre avis, d'être gardé présent à l'esprit, lorsque l'étude génétique repose presque uniquement sur celle de la variation, comme c'est le cas dans la génétique bactérienne.

RÉSUMÉ.

1° L'étude quantitative de la transformation des populations de levure sous l'influence de l'acriflavine montre que le phénomène implique certainement une augmentation considérable de la fréquence de la mutation « petite colonie ». Les taux de mutation atteints au cours des premières heures du processus ont pu être calculés et comparés au taux de mutation spontanée.

2° Le mécanisme intime de la mutation est discuté. L'interprétation proposée comme la plus conforme à l'ensemble des faits décrits dans cette série de mémoires repose sur l'hypothèse suivante : le mutant « petite colonie » diffère de la forme normale par la perte de particules cytoplasmiques autoreproductibles, essentielles à la synthèse d'un groupe d'enzymes respiratoires.

BIBLIOGRAPHIE

- BEADLE (G. W.). *Chem. Rev.*, 1945, **37**, 15.
EPHRUSSI (Boris), HOTTINGUER (Hélène) et CHIMENES (Annie-Marie). *Ces Annales*, 1949, **76**, 351.
EPHRUSSI (Boris), HOTTINGLER (Hélène) et TAVLITZKI (Jean). *Ces Annales*, 1949, **76**, 419.
LINDEGREN (Carl C.). *Bact. Rev.*, 1945, **9**, 111.
LINDEGREN (Carl C.). *Proc. 8th Internat. Congress of Genetics*, Stockholm, 1949.
LINDEGREN (Carl C.) et LINDEGREN (Gertrude). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1946, **11**, 115.
SLONIMSKI (Piotr P.) et EPHRUSSI (Boris). *Ces Annales*, 1949, **77**, 47.
SONNEBORN (T. M.). *Advances in Genetics*, 1947, **1**, 264.
SPIEGELMAN (S.). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1946, **11**, 256.
SPIEGELMAN (S.), LINDEGREN (C. C.) et LINDEGREN (G.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1945, **31**, 95.
STERN (K. G.). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1939, **7**, 312.
WINGE (O.) et ROBERTS (Catherine). *C.R. Labor. Carlsberg*, 1948, **24**, 263.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 5 mai 1949.

Présidence de M. MAGROU.

COMMUNICATIONS

A PROPOS DE DEUX SOUCHES DE LA MALADIE DE NEWCASTLE ISOLÉES EN FRANCE

par P. LÉPINE, H. JACOTOT, P. ATANASIU et A. VALLÉE.

La France a connu dans le passé plusieurs épizooties de peste aviaire vraie. Par contre, aucun cas de maladie de Newcastle n'avait été constaté malgré la présence de cette affection dans les pays voisins, et plus particulièrement en Italie.

Récemment, Lucam (1), Berthelon et Tournut (2), Jacotot (3) signalaient dans le Midi de la France l'apparition d'une peste aviaire. Jacotot et André Vallée (4), à l'occasion d'une épidémie sévissant dans le Var, précisent qu'il s'agit de la maladie de Newcastle.

Nous avons isolé et étudié deux souches, la première originaire du Var et une deuxième souche originaire d'Eure-et-Loir.

Étant donné l'intérêt qu'il y a à poser le diagnostic précis d'une maladie souvent méconnue, la facilité de ce diagnostic par le laboratoire et les particularités présentées par ces deux souches dans leur comportement vis-à-vis de l'œuf embryonné, nous avons cru utile de présenter cette note.

Au premier passage la souche « Var », inoculée sur la membrane chorio-allantoïdienne des œufs de poules, et de canes, s'est montrée virulente pour le cerveau de l'embryon, donnant des lésions hémorragiques massives, mais le liquide allantoïdien ne donnait ni agglutination ni passages positifs en série.

(1) F. LUCAM, *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **147**, 1502 ; *Bull. Acad. Vét.*, 1949, **22**, 67.

(2) BERTHELON et TOURNUT, *Rev. Méd. Vét.*, 1949, **12**, 21.

(3) H. JACOTOT, *Bull. Acad. Vét.*, 1949, **1**, 70.

(4) H. JACOTOT et A. VALLÉE, *Bull. Acad. Vét.*, 1949, **22**, 186.

En partant du cerveau d'embryon nous obtenions les mêmes lésions hémorragiques et pouvions réaliser une hémagglutination avec l'émulsion du cerveau du deuxième passage.

Au cours des passages suivants réalisés par inoculation, soit de la membrane chorio-allantoïdienne, soit du liquide allantoïdien, nous avons noté des lésions typiques : œdème de la membrane, hémorragies sur l'embryon, inclusions et vacuolisation du protoplasma ; l'embryon était mort en quarante-huit heures.

Les œufs de canes ont montré la même sensibilité que les œufs de poules au matériel inoculé.

Le matériel suspect provenant d'Eure-et-Loir, inoculé sur la membrane et dans le liquide, ne provoquait pas de lésions hémorragiques typiques comme la souche précédente, mais le liquide a permis les passages en série et l'hémagglutination.

L'hémagglutination des hématies observée dans la grippe à la fois par Hirst (5) et par Mc Clelland et Hare (6) a été appliquée pour la première fois à la maladie de Newcastle par Burnet (7) et au diagnostic différentiel avec la peste aviaire par D. Lush (8). Nous avons adopté pour nos expériences la méthode employée dans la grippe par Lépine, Sautter et Reinié (9) avec certaines modifications.

TECHNIQUE. — Les souches étant adaptées aux œufs, on obtient l'antigène de la manière suivante : on inocule dans le liquide allantoïdien 0,05 ml. du matériel infectant dilué à 10^{-3} ou 10^{-4} . Entre la trentième et la quarante-huitième heure, les œufs sont mis à la glacière ; quatre heures après on récolte les liquides (amniotique et allantoïdien). A l'ouverture des œufs on fait une première hémagglutination rapide sur lame : I goutte de liquide et II gouttes d'hématies de poules à 0,5 p. 100. Les œufs positifs servent à rechercher les taux d'hémagglutination (tableau I).

Les hématies de poule sont employées à 0,5 p. 100.

Les sérums inhibiteurs sont prélevés sur les poules immunisées contre la maladie de Newcastle et la peste aviaire ; le premier titrage a été fait avec du sérum standard (10).

Les tableaux I et II montrent la technique employée, les dilutions d'antigène et de sérum, les taux d'hémagglutination et d'inhibition obtenus qui permettent de poser le diagnostic de la maladie de Newcastle.

En effet, pour la souche « Var » le taux d'hémagglutination est allé jusqu'à 1/320 et pour la souche « Eure-et-Loir » 1/640.

Les épreuves d'inhibition avec les sérums Newcastle et peste aviaire ont montré une inhibition pour la première et une réaction négative pour la seconde.

CONCLUSIONS. — Nous avons identifié 2 souches de maladie de

(5) G. HIRST, *Science*, 1942, **94**, 22.

(6) W. MAC CLELLAND et H. HARE, *Canadian Publ. Health J.*, 1941, **32**, 530.

(7) F. M. BURNET, *Austr. J. exp. Biol. a. Med.*, 1942, **20**, 81.

(8) D. LUSH, *J. comp. Path. a. Ther.*, 1943, **53**, 157.

(9) P. LÉPINE, V. SAUTTER et L. REINIÉ, *ces Annales*, 1946, **72**, 523.

(10) Nous exprimons nos remerciements au Dr Dobson, Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, qui nous a aimablement adressé ces sérums.

Newcastle assez différentes à l'origine dans leur comportement à l'égard de l'œuf embryonné.

La souche « Var » de type neurotrope lors de son isolement ne tuait l'embryon qu'après quarante-huit heures, donnait une hémagglutination avec le cerveau et ce n'est qu'après 3 passages que ce virus s'est adapté aux liquides de l'œuf.

La souche « Eure-et-Loir », dont le virus s'est répandu uniformément dans l'embryon au premier passage, donnait une hémagglutination et une inhibition avec la suspension de cerveau et les liquides embryonnaires.

Le taux d'hémagglutination pour la souche « Var » était, après 3 passages consécutifs, de 1/320 et pour la souche « Eure-et-Loir » 1/640. Le taux d'inhibition pour les 2 souches était de 1/240.

La technique employée permet de faire aisément le diagnostic de la maladie de Newcastle et de la peste aviaire par la comparaison des taux d'inhibition spécifique.

(Institut Pasteur, Service des virus et Service
de Microbiologie animale.)

EFFETS DE DIVERS ADJUVANTS DANS L'IMMUNISATION DU COBAYE CONTRE LE CHARBON SYMPTOMATIQUE AU MOYEN DE CULTURES FORMOLÉES

par H. JACOTOT.

Nous groupons ici des essais particuliers dans lesquels ont été mis en œuvre des adjuvants dont l'activité intrinsèque ou la valeur pratique se sont révélées dignes d'être retenues au cours d'une étude générale de cette question : le gel d'alumine, la lanoline et le latex d'Hevea.

Dans tous ces essais, on a fait usage de vaccins constitués par une culture de *B. chauvei* en bouillon de foie peptoné, stérilisée par le formol à 37° (vaccin de Leclainche et Vallée). Cette sorte d'anatoxine totale était ensuite divisée en deux ou plusieurs parties ; l'une conservée sous cette forme, mais complétée au volume final des autres, constituait le vaccin témoin ; chacune des autres était additionnée de l'un des adjuvants mentionnés, puis complétée au volume commun.

Le gel d'alumine était incorporé à la culture vaccinale dans la proportion de 30 p. 100 et le latex d'Hevea dans la proportion de 6 p. 100 ; la préparation du vaccin à la lanoline consistait à enrober la suspension vaccinale dans une demi-partie de graisse, puis à diluer dans une quantité d'huile de vaseline représentant huit fois le poids de graisse.

Toutes les expériences ont été faites sur le cobaye. Le vaccin a été injecté ou dans le tissu conjonctif sous-cutané ou dans les muscles.

L'épreuve était effectuée trois semaines après la vaccination ; à cet

effet, chaque animal, vacciné ou témoin non vacciné, recevait par voie musculaire 1 cm³ d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon de foie peptoné.

a) Expérience type :

On constitue quatre séries de 12 cobayes ; chaque série correspond à un vaccin de formule déterminée ; elle est divisée en quatre groupes de chacun 3 cobayes, lesquels sont vaccinés aux doses respectives de 1/8, 1/4, 1/2 et 1 cm³. L'épreuve par inoculation virulente donne les résultats suivants : cobayes ayant reçu le vaccin au gel d'alumine : 8 survivants et 4 morts ; cobayes ayant reçu le vaccin au latex d'Hevea : 10 survivants et 2 morts ; cobayes ayant reçu le vaccin à la lanoline : 9 survivants et 3 morts ; cobayes ayant reçu le vaccin sans adjuvant : 4 survivants et 8 morts ; cobayes témoins non vaccinés : 4 morts sur 4 inoculés.

b) Résultats d'ensemble :

Vaccin au gel d'alumine : sur un total de 77 cobayes vaccinés, dans huit expériences distinctes, 52 ont résisté, soit 67 p. 100 ; vaccin au latex d'Hevea : sur un total de 107 cobayes vaccinés, dans neuf expériences distinctes, 74 ont résisté, soit 69 p. 100 ; vaccin à la lanoline : sur un total de 61 cobayes vaccinés, dans cinq expériences distinctes, 45 ont résisté, soit 73 p. 100 ; vaccin non additionné d'adjuvant : sur 114 cobayes vaccinés dans onze expériences distinctes, 45 ont résisté, soit 39 p. 100. Enfin, les 42 témoins non vaccinés, employés lors des diverses épreuves, sont morts.

Les vaccins au gel et au latex ont engendré une plus forte immunité chez les cobayes qui les ont reçus par voie musculaire (72 p. 100 de résistants) que chez ceux qui les ont reçus par voie hypodermique (59 p. 100 de résistants) ; au contraire, quelle qu'ait été la voie d'introduction, le vaccin témoin a produit les mêmes effets (39 p. 100 de résistants).

Il est à remarquer enfin que, dans toutes les séries, vaccins additionnés d'adjuvants et vaccin témoin, les sujets qui sont morts ont succombé dans des délais de moyenne à peu près uniforme (trente-sept à trente-neuf heures).

CONCLUSION. — L'addition au vaccin formolé communément employé contre le charbon symptomatique, de gel d'alumine, latex d'Hevea ou lanoline permet d'augmenter l'efficacité de ce vaccin dans une mesure notable. Dans nos expériences, ramenée conventionnellement à 100, la proportion de cobayes immunisés par chacun des échantillons de vaccin est passée de 39 (vaccin sans adjuvant) à 67 (vaccin au gel), 69 (vaccin au latex) et 73 (vaccin à la lanoline), tous les témoins non vaccinés ayant été tués par l'inoculation d'épreuve.

(Institut Pasteur.)

LE PHÉNOMÈNE DE WILLIS APRÈS DISPARITION DE LA SENSIBILITÉ TUBERCULINIQUE PAR STREPTOMYCINOTHÉRAPIE

par A. SAENZ et G. CANETTI,

Lorsque l'on réinjecte des bacilles de Koch à un cobaye qui, infecté une première fois par des bacilles avirulents, a guéri de cette infection et est redevenu insensible à la tuberculine, il y a réapparition accélérée de la sensibilité tuberculinique. Ce phénomène, où l'on voit la réinfection sensibiliser plus rapidement qu'une primo-infection égale, a été observé par Willis en 1928 (1) ; il n'a pas retenu l'attention à l'époque ; nous l'avons reproduit, en 1939, chez le cobaye (2), puis chez l'homme (3), et l'un de nous en a précisé les modalités par la suite (4). Le phénomène de Willis est couramment observé lors de revaccinations par le BCG ; il n'est d'ailleurs que le cas particulier d'une loi immunitaire générale.

La streptomycinothérapie entraîne chez une proportion importante des cobayes tuberculeux traités, même s'ils ont été sévèrement infectés, une disparition de la sensibilité tuberculinique. Y a-t-il chez ces cobayes, tout comme chez ceux qui guérissent spontanément d'une infection avirulente, retour accéléré de la sensibilité tuberculinique lors d'une réinfection ?

Soixante-douze cobayes sont infectés par 1/100 de mg. de la souche humaine virulente H. 37, injecté par voie intramusculaire. Dix-sept de ces cobayes sont laissés comme témoins ; ils succombent en deux à quatre mois à une tuberculose généralisée. Les 55 cobayes restants sont soumis, à partir du vingt et unième jour de l'infection, à la streptomycinothérapie : ils reçoivent 8 mg. de streptomycine par jour, en une seule injection sous-cutanée ; le traitement est poursuivi pendant soixante-dix jours ; les cobayes reçoivent ainsi, au total, 560 mg. de streptomycine. Au vingt-cinquième jour de l'infection, soit au début du traitement, tous les animaux réagissent à 10 mg. de tuberculine en injection intra-dermique ; 32 animaux sur 55, soit 58 p. 100, ont des réactions à 2 + + ou + + + ; 22 animaux sur 55, soit 40 p. 100, réagissent également à 1 mg. de tuberculine. Au trente-neuvième jour du traitement, la sensibilité tuberculinique des animaux a déjà fortement fléchi ; les réactions à 10 mg. de tuberculine sont beaucoup plus faibles, et 14 animaux seulement sur 50, soit 28 p. 100, réagissent encore à 1 mg. Au soixante-sixième jour du traitement — quatre jours avant sa fin — aucun animal ne réagit plus à 1 mg ; 22 seulement sur

(1) H. S. WILLIS, *Am. Rev. Tub.*, 1928, **48**, 240.

(2) A. SAENZ et G. CANETTI, *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 252.

(3) G. CANETTI et H. LACAZE, ces *Annales*, 1940, **65**, 435.

(4) G. CANETTI, *L'allergie tuberculeuse chez l'homme*, Flammarion, édit., Paris, 1946, 84-93.

(5) COURCOUX, BOULENGER et MACLOUF, *Rev. Tub.*, 1943, **8**, 165.

48, soit 46 p. 100, réagissent à 10 mg., et cela par des réactions très faibles.

De ce lot de cobayes, destinés à renseigner sur l'évolution à longue échéance de l'infection tuberculeuse traitée par streptomycine, 10 sont prélevés ; ils sont réinfectés, quatre jours après la dernière injection de streptomycine, par 1/100 de mg. de la souche bovine virulente Dupré, injecté par voie intra-dermique dans le flanc gauche. Dix cobayes neufs témoins reçoivent la même injection. La sensibilité tuberculinique de tous ces animaux est éprouvée sept jours plus tard par 2 intradermo-réactions, l'une à 10 mg., l'autre 1 mg. de tuberculine. Les résultats sont les suivants.

Aucun des animaux neufs témoins ne réagit à 1 mg. de tuberculine ; 6 animaux sur 10 ne réagissent pas non plus à 10 mg. ; des 4 restants, 2 donnent à cette dilution une réaction douteuse et 2 une réaction à 1 +. Tout autre est le comportement des animaux réinfectés. Tous les 10 étaient, avant la réinfection, insensibles à 1 mg. : 6 fournissent maintenant une réaction à 1 +, 3 une réaction douteuse, et 1 une réaction négative. 6 de ces 10 animaux étaient également insensibles à 10 mg. ; ils fournissent maintenant : une réaction à 3 + + +, 2 réactions à 2 + +, et 3 à 1 + ; des 4 animaux restants, 2 donnaient à 10 mg. une réaction douteuse : ils donnent maintenant une réaction à 2 + + et une à 3 + + + ; chez un autre animal, une réactivité à 1 + s'est changée en réactivité à 3 + + + ; enfin, chez un dernier animal, la réaction, qui était de 2 + +, n'est que de 1 + : il y a donc eu, dans ce seul cas, affaiblissement de la sensibilité.

Signalons que, chez tous les animaux réinfectés, le nodule d'infection dermique apparaît plus précocement et évolue plus rapidement que chez les animaux témoins ; cinq fois, il s'entoure, lors des épreuves tuberculiniques du septième jour, d'un halo inflammatoire ; dans ces 5 cas, il y a également reviviscence des épreuves tuberculiniques faites onze jours auparavant.

Au total, on voit qu'il y a, chez tous les animaux désensibilisés et réinfectés, réapparition *précoce* de l'allergie, et d'une allergie assez intense. Chez les animaux non complètement désensibilisés, il y a de même, sauf dans un cas, renforcement *précoce* de l'allergie. Le phénomène de Willis s'observe donc bien après streptomycinothérapie, tout comme il s'observe après guérison spontanée d'une infection avirulente.

On doit s'interroger sur la signification de ce phénomène. Le retour accéléré de l'allergie peut s'interpréter de deux manières. On peut concevoir qu'il y ait, dans les cellules de l'organisme désensibilisé, persistance d'une sorte de sensibilité subliminaire, et qu'il suffise dès lors de l'apport d'une dose nouvelle d'antigène sensibilisant *très peu importante* — telle qu'elle doit être libérée dans n'importe quel foyer tuberculeux, du fait des destructions et des désintégrations bacillaires qui s'y opèrent — pour réédifier dans les cellules une sensibilité tuberculinique constatable objectivement. Mais on peut concevoir aussi qu'il y ait, chez l'animal désensibilisé, persistance d'une *immunité résiduelle*, que cette immunité — qui consiste, en tuberculose, en une aptitude accrue des phagocytes à détruire et à désintégrer le bacille de Koch — aboutisse dans le nodule de surinfection à la destruction rapide d'un grand nombre de bacilles, et que ce soit donc

par la diffusion précoce d'une dose d'antigènes sensibilisants *massive* que s'explique, dans le phénomène de Willis, la rapidité de la resensibilisation. Dans le premier cas, ce phénomène n'aurait pas de signification immunitaire ; il en aurait une, et fort importante, dans le second. Sans que l'on puisse encore trancher formellement entre l'une et l'autre explication, qui ne s'excluent d'ailleurs pas, on doit remarquer que l'apparition et l'évolution accélérée du nodule dermique au point de réinjection des bacilles plaident bien en faveur de l'intervention d'une immunité résiduelle. Cette constatation doit inciter à étudier, d'une manière plus approfondie, la question de la persistance de l'immunité de surinfection après streptomycinothérapie

(Institut Pasteur, Laboratoire de Recherches sur la Tuberculose.)

SUR UNE RÉACTION CYTOCHIMIQUE EN RAPPORT AVEC LA VIRULENCE DES MYCOBACTÉRIES

par P. HAUDUROY et Y. POSTERNAK-GALLIA.

R. Dubos et Gardner Middlebrook (1) ont récemment indiqué une réaction permettant de révéler certaines propriétés cytochimiques des bacilles tuberculeux et de distinguer ainsi les souches virulentes des souches avirulentes.

Les cellules bactériennes lavées à plusieurs reprises dans de l'alcool méthylique à 50 p. 100 sont mises en suspension dans une solution aqueuse, contenant 5 p. 100 de NaCl et 1 p. 100 de barbiturate de sodium (ou d'une autre substance agissant comme un tampon alcalin) afin d'obtenir un pH de 8,9.

A cette solution, on ajoute une petite quantité de solution aqueuse de rouge neutre et on observe un virage immédiat du rouge au jaune. En cinq à trente minutes, les bacilles en suspension dans le mélange se colorent en rouge s'ils sont virulents, en jaune s'ils sont avirulents.

R. Dubos a opéré sur 22 souches de bacilles tuberculeux humains (souches H 37 Ra et H 37 Rv comprises) et bovins (BCG compris) et a toujours constaté une concordance de sa réaction avec la virulence du bacille étudié.

Reprenant cette réaction et opérant sur 58 bacilles tuberculeux humains, 5 bacilles bovins, 4 bacilles aviaires et 67 bacilles paratuberculeux (2), nous avons confirmé sa valeur.

Disons tout de suite qu'il existe pour nous des degrés dans l'intensité des colorations obtenues, qui peuvent varier du rouge pourpre au rose. Les couleurs observées sont différentes les unes des autres, mais assez difficiles à définir, et nous les indiquons approximativement dans le tableau ci-dessous.

(1) R. DUBOS et Gardner MIDDLEBROOK, *Amer. Rev. Tub.*, 1948, 58, 698.

(2) P. HAUDUROY et Y. POSTERNAK, *C. R. Acad. Sci.*, 1949, 228, 781.

COLORATION prise par les bactéries en suspension dans le mélange	SYMBOLE	EXEMPLES
Rouge pourpre. Rouge pourpre moins intense.	+++ ++	Souche H37Rv et mycobactéries provenant de matériel pathologique.
Rose.	+	
Jaune	—	Souche H37Ra, <i>Myco. smegmatis</i> , <i>Myco. phlei</i> , etc... Souche homogène de Courmont, souche Cummins.

Il y a lieu de remarquer que le BCG (origine Institut Pasteur de Paris et Institut sérothérapique de Copenhague) donne une réaction faiblement positive.

Nous avons étendu nos recherches à d'autres Mycobactéries et à des germes appartenant à d'autres genres pour juger de la spécificité de la réaction.

Huit Actynomyces (4 pathogènes, 4 non pathogènes), 4 bacilles diphtériques virulents et toxigènes (dont la souche Park et Davis), 4 bacilles pseudo-diphtériques, 10 staphylocoques (6 : coagulase positive ; 4 : coagulase négative) ont tous donné des résultats négatifs (—).

Soixante-sept bacilles paratuberculeux nous avaient donné des résultats négatifs. L'examen de 90 autres souches a confirmé ces résultats.

Mais, fait curieux et qui nous paraît particulièrement intéressant, 4 bacilles acido-alcool-résistants, ayant des caractères cultureux qui les rapprochent des bacilles paratuberculeux, semblant posséder un certain pouvoir pathogène pour le cobaye (mais un pouvoir pathogène anormal) ont donné des résultats positifs.

En voici la liste :

NUMÉRO de la souche	RÉSULTAT	ORIGINE
95	++	Isolée par le Dr Riva, de Bogota, en 1946 d'une larve de <i>Pulex irritans</i> nourrie avec une émulsion de lépreux
900	+	Isolée par le Dr Reig [Barcelone] (4).
903	++	Isolée par le Dr Reig [Barcelone] (4).
904	++	Isolée par le Dr Reig [Barcelone] (4).

(1) Dr Ramon Cullerell Reig : Estudio comparado de « los bacilos de los grillos ». Publicaciones del Instituto Antituberculoso Francisco Moragas, 1943.

De l'ensemble de ces recherches, on peut tirer, semble-t-il, les premières conclusions suivantes :

a) Les Mycobactéries produisant une tuberculose expérimentale typique donnent toujours une réaction de Dubos fortement positive.

b) Les Mycobactéries ne produisant pas de tuberculose expérimentale donnent des réactions nettement négatives (—).

Il est donc possible, grâce à la réaction de Dubos, de différencier rapidement les Mycobactéries avirulentes.

Mais il est d'autres bacilles acido-alcoolo-résistants sur lesquels la réaction de Dubos appelle particulièrement l'attention : il s'agit des Mycobactéries donnant une réaction positive (+ ou ++), possédant des caractères cultureux qui les rapprochent des bacilles paratuberculeux et un pouvoir pathogène incontestable, qui n'est cependant pas celui d'un bacille de Koch authentique.

Ces germes sont très mal connus et rarement signalés : la réaction de Dubos confirme ce que nous soupçonnions déjà : à savoir qu'il semble exister tous les degrés entre le bacille tuberculeux de virulence classique et les bacilles acido-alcoolo-résistants parfaitement avirulents. Elle permettra de mettre à nouveau en évidence des souches appartenant à ce dernier groupe.

(Institut d'Hygiène et de Bactériologie. Lausanne.)

RECHERCHES SUR LA RÉDUCTION DES NITRATES EN NITRITES, EN AÉROBIOSE, PAR QUELQUES GERMES OLIGONITROPHILES DU SOL

(DEUXIÈME NOTE)

par J. KAUFFMANN.

La dénitrification ne s'effectue pas seulement dans des conditions anaérobies. Seiser et Walz (1) ont remarqué un dégagement d'azote gazeux à partir des nitrates avec *Ps. putida* dans des conditions aérobies. Korochkina (2) note même que la réduction des nitrates par le *Ps. denitrofluorescens* n'est que très faiblement inhibée par un barbotage d'air dans le milieu de culture. J. Meiklejohn (3), opérant dans des conditions bien déterminées avec un milieu synthétique, montra avec *Pseudomonas* que la dénitrification, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, exige des substances organiques appropriées.

Poursuivant nos recherches sur les oligonitrophiles, nous avons constaté que certains de ceux-ci sont capables de réduire les nitrates en nitrites. Voici les détails de nos expériences :

Nous utilisons une souche isolée en A.O.F. [souche E] (4) et deux souches provenant de glaciers alpins. La croissance est mesurée à

(1) A. SEISER et L. WALTZ, *Arch. Hyg.*, 1925, **95**, 189.

(2) O. I. KOROKHINA, *Microbiology*, 1936, **5**, 645.

(3) J. MEIKLEJOHN, *Annals appl. Biol.*, 1940, **26**, 558.

(4) J. KAUFFMANN, J. POCHON et Y. T. TCHAN, *Ces Annales*, 1948, **75**, 83.

l'aide du photomètre de Meunier. Les nitrates sont recherchés par le réactif à la diphenylamine sulfurique après destruction des nitrites par SO_4H_2 en présence d'urée. On dose les nitrites avec le réactif de Griess à l'aide du photomètre.

Les courbes de croissance sont traduites en échelle logarithmique, la production des nitrites en échelle normale. Toutes les cultures sont portées à la température de 30° . Ces techniques ont donné les résultats suivants :

1° Avec la souche d'A. O. F. cultivée sur milieu Winogradsky glucosé (5) à 30° en boîtes de Roux :

a) En présence de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ seul comme source azotée à la dose

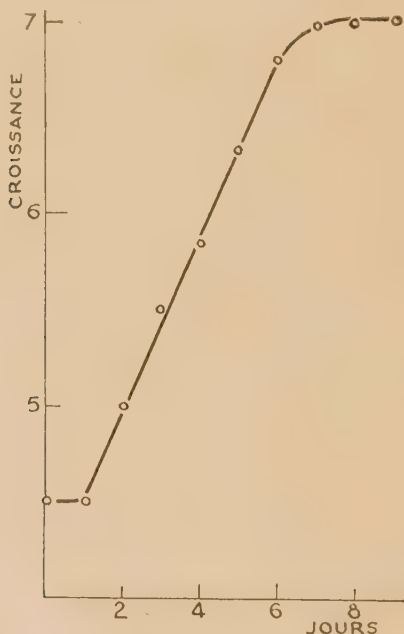


FIG. 1.

de 0,2 p. 100, nous obtenons une courbe de croissance normale (courbe en S) [fig. 1] ;

b) En présence de NO_3K , seul à 0,1 p. 100, nous obtenons une courbe de croissance présentant un palier intermédiaire CD (fig. 2) ;

c) Avec NO_3K (0,1 p. 100) et $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 0,05 p. 100, nous obtenons une courbe de croissance à 3 paliers (fig. 3).

L'expérience a est faite avec 100 cm^3 de milieu de culture par boîte de Roux. Les expériences b et c avec 250 cm^3 .

La figure 2 (NC_5K seul) montre que le taux de croissance diminue à partir de B pour s'annuler en C. La croissance reprend lorsque tout le nitrate a été réduit en nitrite (point D).

En présence de NO_3K et de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ [fig. 3], nous remarquons également un arrêt de la croissance (AB) correspondant à une forte production de nitrites. En B, il n'y a plus de nitrates, et la quantité de nitrites formée correspond, aux erreurs d'expérience près, à la réduction totale des nitrates ajoutés dans le milieu de culture. Cette quantité maximum de nitrite se maintient jusqu'au point E. Le germe n'utilise donc que $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ jusqu'au point C.

A ce moment, la réaction avec le réactif de Nessler devient négative. De C à D, le germe semble passer par une période d'adaptation afin

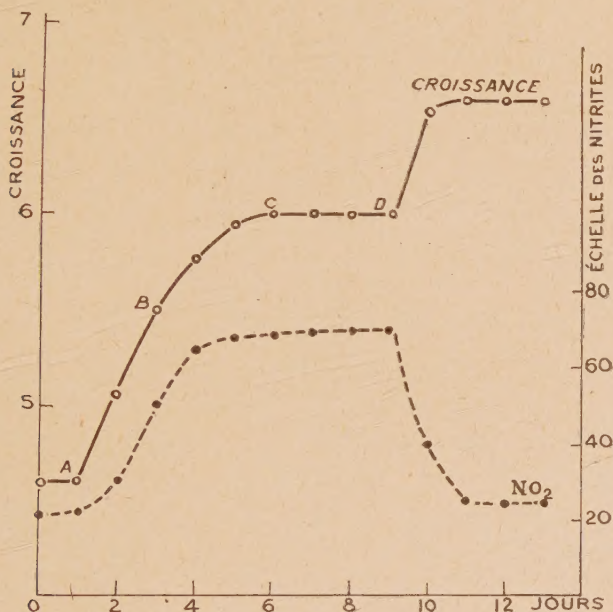


FIG. 2.

de pouvoir utiliser les nitrites comme source azotée. En D, la croissance reprend et le taux de nitrites diminue.

De ces faits, il ressort que ce germe possède un réel pouvoir de réduire quantitativement les nitrates en nitrites. Mais comment expliquer cette action perturbatrice de la production de nitrites sur la croissance des germes ?

Le nitrate par lui-même n'est pas toxique à la dose employée au cours de nos expériences. En effet, la courbe de croissance débute normalement en présence de ce dernier. Il en est de même pour les nitrites : la dernière phase exponentielle le prouve. Le phénomène paraît assez complexe et semble être d'origine enzymatique.

2° Avec les souches de provenance glaciaire on constate que la réduction des nitrates en nitrites est d'autant plus rapide que le germe se trouve dans des conditions plus aérobies.

a) Cultures faites dans des fioles d'Erlenmeyer soumises à un barbotage d'air.

En présence de nitrate de potassium (0,1 p. 100) comme source azotée, on remarque, après douze heures, une production intense de nitrite.

En présence de NO_3K à 0,1 p. 100 et de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 0,2 p. 100, aucune production de nitrites n'a lieu.

b) Culture en boîte de Roux avec 200 cm³ de milieu de culture par



FIG. 3.

flacon, en milieu nitraté : la production de nitrites est insignifiante, bien que la croissance soit encore assez rapide. Même phénomène que précédemment en présence de nitrate et de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: c'est-à-dire production nulle de nitrites (au cours de nos expériences, nous nous sommes assuré que NO_2 n'est pas réduit en NH_3).

Dans les cas précités où la production de nitrites est nulle ou insignifiante (milieu ammoniac-nitrique ou milieu au nitrate seul en conditions semi-aérobies), l'addition de lactate de calcium à la dose de 0,10 p. 100 provoque, après une dizaine d'heures, une production intense de nitrites. Il semble donc bien que la réduction des nitrates en nitrites pour ces deux germes soit liée à la présence d'un méta-

bolite comme le lactate. Celui-ci ne s'accumulerait que dans certaines conditions (par exemple en milieu glucosé nitraté en aérobiose).

Nous avons étudié le pouvoir réducteur de ces germes. Les cultures sont faites en tubes d'Yvan Hall non régénérées, de façon à permettre une certaine croissance. On ajoute dans chacun des tubes 1 goutte de différents colorants indicateurs de rH en solution à 2 p. 1.000. Les colorants employés sont le bleu de méthylène, le bleu de Nil, la phénosafranine et le rouge neutre. On remarque que la souche d'A. O. F. possède un pouvoir réducteur très faible (le bleu de méthylène ne se décolore pas). Les souches d'origine glaciaire, par contre, réduisent dans l'espace de quelques jours les quatre colorants. Cette réduction a lieu même avec barbotage d'air dans le milieu de culture. Dans ces conditions nous avons opéré de la façon suivante pour la mesure du rH. Chaque jour, on prélève une certaine quantité de milieu que l'on répartit dans quatre tubes à hémolyse contenant chacun 1 goutte des différents colorants. La lecture est faite après une heure à la température du laboratoire. La lecture faite ne varie pas dans les vingt-quatre heures qui suivent. Si l'on mesure en même temps la croissance du germe, on remarque que la période de latence correspond à la chute du rH. La phase de croissance ne devient exponentielle qu'après réduction du rouge neutre et ce niveau maximum de potentiel d'oxydo-réduction se maintient pendant toute la croissance du germe.

Il semble donc que la réduction des nitrates par ces germes aérobies soit moins liée au pouvoir réducteur de ceux-ci qu'à la présence d'un métabolite indispensable à la réduction des nitrates en nitrites.

Tel germe ne réduisant pas les nitrates en nitrites en présence d'une certaine matière organique sera capable, au contraire, de les réduire en présence d'une autre matière organique. Ce métabolite indispensable peut s'accumuler ou non dans le milieu suivant que le métabolisme du germe, variable suivant les conditions de culture, sera ou non favorable à cette accumulation.

(Institut Pasteur. Service de Microbie technique.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Action de la streptomycine sur *Mycobacterium tuberculosis*, par contact direct ou à travers des bougies filtrantes, par P. J. COLETSOS.

Sur les modalités d'apparition des variantes résistantes du bacille de Koch au cours du traitement tuberculeux par la streptomycine, par G. CANETTI et A. SAENZ.

Etude du mode de multiplication du bacille tuberculeux aviaire (*Mycobacterium avium*) dans le milieu de culture de Dubos, par J. BRETEY et M^{me} S. IMELIK.

Recherches sur la croissance du bacille aviaire (*Mycobacterium avium*) en culture homogène, par M^{me} S. IMELIK et J. BRETEY.

Q fever expérimentale de quelques animaux domestiques, par G. BLANC.

Déshydrogénation de l'acide β -hydroxybutyrique par *B. megatherium*, par M. LEMOIGNE, C. PEAUD LENOËL et M^{me} M. CROSON.

ERRATUM

Ces *Annales*, 76, mémoire Boris Ephrussi, Hélène Hottinguer et Jean Tavlitzki, p. 442, 4^e paragraphe, 5^e ligne : *Au lieu de* : « Il paraît *peu* probable qu'il s'agisse d'un cas d'hérédité cytoplasmique », *lire* : « Il paraît *plus* probable qu'il s'agit d'un cas d'hérédité cytoplasmique.

XXIX^e CONGRÈS D'HYGIÈNE

Le XXIX^e Congrès d'Hygiène, organisé par la Société de Médecine publique et de Génie sanitaire, se tiendra dans le courant du mois d'octobre 1949, à Paris, dans le Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur, sous la présidence de M. Verge, Professeur à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, Président de la Société pour 1949.

Des rapports et des communications seront présentés sur :

L'épidémiologie, la prophylaxie et le traitement des brucelloses ;

La réforme hospitalière. Techniques nouvelles dans la construction et l'aménagement des établissements sanitaires.

Pour tous renseignements concernant cette manifestation, prière de s'adresser à M. le Dr Petit-Maire, Secrétaire général, 1, rue de Tilsitt, Paris (17^e).

Le Gérant : G. MASSON.